

Université de Sherbrooke

**Caractérisation des mécanismes régulateurs de la
régénération épithéliale gastrique humaine**

**Par
Marie-Pier Tétreault
Département d'anatomie et de biologie cellulaire**

**Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
En vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie cellulaire**

Mai 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-30976-6

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-30976-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
RÉSUMÉ	XVI
I- INTRODUCTION	1
1. Épithélium gastrique	1
1.1 Histologie des unités fonctionnelles de l'épithélium gastrique	1
1.2 Mécanismes de défense de l'épithélium gastrique	4
1.3 Ulcération gastrique	10
2. Migration cellulaire	15
3. Régénération épithéliale	19
3.1 Définition et description de la régénération épithéliale	19
3.2 Rôle des facteurs de croissance dans la régulation de la régénération épithéliale gastrique <i>in vivo</i>	26
3.3 Rôle des facteurs de croissance dans la régulation de la régénération épithéliale gastro-intestinale <i>in vitro</i>	29
4. Signalisation intracellulaire associée à la migration cellulaire	33
4.1 Voie de signalisation des MAPK ERK1/2	33
4.1.1 Rôle des MAPK ERK1/2 dans la régulation de la migration cellulaire	37
4.2 Voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)	38

4.2.1	La sérine/thréonine kinase Akt	41
4.2.2	Rôle de la PI3K et d'Akt dans régulation de la migration cellulaire	42
4.3	Voies de signalisation des RhoGTPases	43
4.3.1	Rôle des RhoGTPases dans la régulation de la migration cellulaire	46
4.4	Voie de signalisation mTOR/p70S6K	47
4.4.1	Rôle de la p70S6K dans la régulation de la migration cellulaire	51
4.5	Voie de signalisation ILK	51
4.5.1	Rôle de ILK dans la régulation de la migration cellulaire	54
4.6	Voie de signalisation Src	55
4.6.1	Rôle de Src dans la régulation de la migration cellulaire	58
5.	Régénération épithéliale gastrique	58
5.1	Problématique	58
5.2	Modèles cellulaires	59
5.2.1	Les cellules HGE (HGE-17 et HGE-20)	59
5.2.2	Culture primaire d'épithélium gastrique humain	60
5.3	Objectifs	63
II-	MATÉRIELS ET METHODES	65
1.	Culture cellulaire	65

2. Essais de blessure	66
2.1 Blessure avec une lame de rasoir	66
2.2 Quantification de la régénération/restitution	68
2.3 Essais de micro-blessure	68
3. Microscopie électronique à balayage et à contraste de phase	70
4. Microscopie à fluorescence	70
5. Index de motilité et de prolifération	72
6. Immunobuvardage de type Western	72
7. Viabilité cellulaire et essai TUNEL	74
7.1 Essai TUNEL	74
7.2 Activité de la caspase-3	74
8. Transfections transitoires et essai luciférase	75
9. Vecteurs d'expression	76
10. Production virale et infections rétrovirales	76
11. Essais de phosphorylation de pp60c-Src	77
12. Méthode de nucléofection pour l'incorporation d'un siRNA	78
13. Essai kinase ILK	79
14. Analyse RT-PCR	80
15. Enrichissement de membranes	81
16. Analyses statistiques	81

III- RÉSULTATS

1. Effet différentiel de l'induction et de la modulation de la régénération épithéliale gastrique humaine	82
---	----

1.1	Dynamiques de régénération	82
1.2	Quantification de la régénération et de la restitution	85
1.3	Prolifération cellulaire et apoptose	91
1.4	Un mécanisme TGF β -indépendant	94
1.5	Altération de la morphologie épithéliale	97
1.6	Jonctions épithéliales	106
2.	L'activation de la PI3K par le récepteur à l'EGF promeut la restitution des monocouches épithéliales gastriques humaines blessées	109
2.1	Les voies de signalisation dépendantes de la PI3K contrôlent la migration de cellules épithéliales gastriques	109
2.2	La signalisation via le récepteur à l'EGF (EGFR) est nécessaire à la migration cellulaire gastrique en condition basale et stimulée au TGF α	118
2.3	Rôle de pp60c-src dans la transactivation de l'EGFR et dans la restitution épithéliale gastrique	127
2.4	Rôle des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 1$ des intégrines dans la restitution épithéliale gastrique	128
2.5	L'activation des effecteurs en aval de la PI3K Akt, p70S6K et ILK module la migration cellulaire gastrique induite par une blessure	134
2.6	Impact des inhibiteurs pharmacologiques sur la viabilité cellulaire	143
3.	L'EGFR, la PI3K et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ sont requis pour la modulation de l'étalement des feuillets épithéliaux au cours de la restitution	

épithéliale gastrique	143
3.1 Dynamique d'étalement cellulaire	146
3.2 Les facteurs de croissance exogènes EGF et TGF α sont des inducteurs majeurs de l'étalement cellulaire épithélial gastrique	153
3.3 Les micro-blessures induites dans des monocouches de cellules HGE-17 se referment grâce à la formation d'un anneau de contraction d'actine et par la formation de protrusions lamellaires	156
3.4 Rôles des voies de signalisation Src, EGFR et PI3K dans l'étalement des cellules épithéliales gastriques	165
3.5 Les effecteurs en amont de la PI3K, p70S6K et ILK ne sont pas impliqués dans la modulation de l'étalement des cellules épithéliales gastriques suite à une microblessure	168
3.6 L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ contrôle l'étalement des feuillettes de cellules épithéliales gastriques suite à une microblessure	171
IV- DISCUSSION	178
V- PERSPECTIVES	216
VI- CONCLUSIONS	222
VII- REMERCIEMENTS	224
VIII- RÉFÉRENCES	227

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I-INTRODUCTION

Figure 1.	Axe foveolus-glande et épithélium gastrique.	3
Figure 2.	Compartimentalisation histologique et fonctionnelle de l'axe-foveolus-glande de la muqueuse gastrique humaine.	6
Figure 3.	Mécanismes de défense de la muqueuse gastrique.	9
Figure 4.	L'ulcération gastrique.	12
Figure 5.	Cycle de motilité cellulaire.	17
Figure 6.	Phases de la régénération épithéliale gastrique.	21
Figure 7.	Représentation schématique des 3 zones morphologiques observées dans les monocouches de cellules épithéliales en migration suivant une blessure.	24
Figure 8.	Expression temporelle de différents gènes durant la réparation d'un ulcère gastrique.	28
Figure 9.	Résumé de l'effet de différents facteurs de croissance exogènes dans la modulation de la restitution épithéliale gastrique <i>in vitro</i> .	32
Figure 10.	La voie de signalisation MAPK ERK1/2.	36
Figure 11.	La voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K).	40
Figure 12.	Mécanismes d'activation et d'inhibition des RhoGTPases.	45
Figure 13.	La voie de signalisation de la p70S6K.	50

Figure 14.	La voie de signalisation ILK.	53
Figure 15.	La voie de signalisation Src.	57
Figure 16.	Modèles cellulaires utilisés pour l'étude de la régénération épithéliale gastrique humaine.	62

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

III- RÉSULTATS

Figure 17.	Effet des facteurs de croissance HGF, IGF-I et TGF α sur la régénération des monocouches de cellules HGE blessées.	84
Figure 18.	Quantification de la régénération et de la restitution des cellules épithéliales gastriques en présence des facteurs de croissance.	87
Figure 19.	Quantification de la zone recouverte par les cellules régénératrices en présence des facteurs de croissance.	90
Figure 20.	Effet des facteurs de croissance HGF, IGF-I, IGF-II, EGF et TGF α sur la prolifération des monocouches de cellules HGE blessées.	93
Figure 21.	Évaluation de la viabilité des cellules HGE-17 blessées en en absence ou en présence de génistéine et cytochalasine D.	96
Figure 22.	La restitution des monocouches de cellules HGE blessées se fait de manière indépendante du TGF β .	99

Figure 23.	Évaluation de la forme cellulaire et de la motilité par le marquage de l'actine-F.	102
Figure 24.	Effet des facteurs de croissance HGF, IGF-I, IGF-II, EGF et TGF α sur l'indice de motilité des monocouches de cellules HGE blessées.	105
Figure 25.	Évaluation de la morphologie cellulaire durant la migration des monocouches de cellules HGE blessées.	108
Figure 26.	Expression des protéines de jonctions de type épithélial dans les monocouches de cellules HGE-17 en régénération.	110
Figure 27.	Expression et localisation de la cadhérine-E dans des monocouches de cellules HGE-17 en régénération.	114
Figure 28.	Rôle de la PI3K et des MAP Kinases ERK1/2 dans la restitution des cellules épithéliales gastriques humaines.	117
Figure 29.	La signalisation via la PI3K est nécessaire pour la migration cellulaire gastrique basale ou stimulée au TGF α .	120
Figure 30.	La signalisation via l'EGFR est nécessaire pour la migration cellulaire gastrique basale ou stimulée au TGF α .	123
Figure 31.	La signalisation via l'EGFR est nécessaire pour l'activation de PI3K/Akt.	126

Figure 32.	Rôle de pp60c-Src dans la transactivation de l'EGFR et dans la restitution épithéliale gastrique.	130
Figure 33.	Rôle des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 1$ des intégrines dans la restitution épithéliale gastrique.	133
Figure 34.	Rôle de la kinase Akt dans la restitution épithéliale gastrique.	136
Figure 35.	Rôle de la kinase p70S6K dans la restitution épithéliale gastrique.	139
Figure 36.	Rôle de la kinase IKK dans la restitution épithéliale gastrique.	142
Figure 37.	Analyse de la viabilité des cellules HGE-17 en présence de DMSO, LY294002, PP2, PD153035, génistéine et cytochalasine D.	145
Figure 38.	Séquences d'événements survenant durant la fermeture des blessures des monocouches de cellules HGE-17.	149
Figure 39.	Séquences d'événements survenant durant la fermeture des blessures des monocouches de cellules HGE-17 en présence de TGF α .	152
Figure 40.	Évaluation de la morphologie cellulaire durant l'étalement des monocouches de cellules HGE blessées.	155
Figure 41.	Progression de la fermeture de la blessure dans les monocouches de cellules HGE-17 en présence de FBS 0,1 % et de TGF α , EGF, HGF, IGF-I.	158

Figure 42.	Évaluation de la morphologie cellulaire par un marquage de l'actine-F.	161
Figure 43.	Expression de la tubuline- α dans les feuillets épithéliaux de cellules HGE-17 en étalement suivant l'induction d'une micro-blessure.	164
Figure 44.	Les réarrangements de l'actine-F et de la tubuline- α sont nécessaires à la modulation de l'étalement des feuillets épithéliaux gastriques suivant l'induction d'une micro-blessure.	167
Figure 45.	La signalisation via la voie de signalisation EGFR/PI3K est nécessaire à l'étalement cellulaire gastrique en condition basale ou stimulée au TGF α .	170
Figure 46.	L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est nécessaire pour l'étalement des cellules épithéliales gastriques suivant l'induction d'une micro-blessure, en conditions basales ou en présence de TGF α .	174
Figure 47.	L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ régule la formation des lamelles suivant l'induction de micro-blessures au niveau des monocouches épithéliales gastriques.	177

IV- DISCUSSION

Figure 48.	Représentation schématique de l'action différentielle des facteurs de croissance sur les cellules épithéliales gastriques humaines blessées (cellules HGE-17) et
------------	--

	sur les différents événements cellulaires impliqués dans la séquence de régénération épithéliale.	188
Figure 49.	Schématisation des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la restitution épithéliale gastrique humaine basale et stimulée au TGF α .	200
Figure 50.	Résumé des facteurs de croissance, des voies de signalisation et des intégrines impliqués dans la régulation de l'étalement cellulaire au cours de la restitution épithéliale gastrique humaine basale et stimulée au TGF α .	211
Figure 51.	Modèle de régénération épithéliale gastrique.	214

ABRÉVIATIONS

Actine-F :	Actine filamenteuse
ATF-2 :	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATP :	Adenosine triphosphate
bFGF :	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
Cad-E :	Cadhérine-E
CEF :	<i>Chicken embryo fibroblasts</i>
CH-ILKBP :	<i>Calponin homology domain-containing integrin-linked kinase-binding protein</i>
EGF :	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR :	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
Egr-1 :	<i>Early growth response factor-1</i>
ERK :	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS :	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF :	<i>Fibroblast growth factor</i>
FRAP :	<i>FKBP 12-rapamycin-associated protein</i>
GEF :	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GAP :	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI :	<i>Guanine-nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP :	Guanosine 5'-diphosphate
GTP :	Guanosine 5'-triphosphate
GSK3- β :	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
H ⁺ :	Ion hydrogène
HCl :	Acide chlorhydrique

HGE :	<i>Human gastric epithelial</i>
HGF :	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HGFR/c-met :	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
HGL :	<i>Human gastric lipase</i>
HGM :	<i>Human gastric mesenchymal cells</i>
HIM:	<i>Human intestinal mesenchymal cells</i>
HUVEC :	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IEC :	<i>Intestinal epithelial cells</i>
IFN- γ :	<i>Interferon-gamma</i>
IGF :	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL :	<i>Interleukine</i>
ILK ;	<i>Integrin-linked kinase</i>
IMGE-5 :	<i>Immortalized mouse gastric epithelial cell line</i>
IPP :	<i>ILK, PINCH, parvins</i>
ITF :	<i>Intestinal trefoil factor</i>
JNK :	<i>Jun amino-terminal kinase</i>
KGF :	<i>Keratinocyte growth factor</i>
LPA :	<i>Lysophosphatidic acid</i>
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK :	<i>MAPK kinase</i>
MAPKKK :	<i>MAPKK kinase</i>
mTOR :	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MUC :	<i>Mucine</i>

p70S6K :	70 kDa ribosomal S6 kinase
PDGF :	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR :	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PDK :	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
Pg :	Pepsinogène
PgE2 :	Prostaglandines E2
PH :	<i>Pleckstrin homology</i>
PHT :	<i>Portal hypertensive</i>
PI3K :	Phosphatidylinositol-3-kinase
Poly (A) :	Polyadénosine
PtdIns :	Phosphatidylinositol
Ser :	Sérine
SH :	<i>Src homology</i>
TGF α :	<i>Transforming growth factor-alpha</i>
TGF β :	<i>Transforming growth factor-beta</i>
Thr :	Thréonine
TFF :	<i>Trefoil factor family</i>
VEGF :	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZO-1 :	Zonula-occludens-1

RÉSUMÉ

L'intégrité de la muqueuse gastrique est maintenue en dépit d'agressions multiples par une série de processus de défense et de réparation. La capacité de régénération de l'épithélium gastrique *in vivo* est bien connue. Cependant, nos connaissances des modulateurs spécifiques impliqués et de leurs mécanismes d'actions dans la régulation de la régénération des cellules épithéliales gastriques, spécialement chez l'humain sont très fragmentaires. Récemment, la caractérisation de nouvelles lignées épithéliales gastriques humaines formant pour la première fois une monocouche barrière a permis l'identification et la discrimination des facteurs de croissance et des mécanismes d'action contrôlant spécifiquement les différentes phases de la régénération épithéliale gastrique humaine.

Dans un premier temps, nos travaux sur les cellules épithéliales gastriques humaines ont permis de démontrer que les facteurs de croissance EGF, TGF α , HGF et IGFs accélèrent la restitution épithéliale, indépendamment de la voie de signalisation du TGF β . Par la suite, nous avons établi l'implication différentielle de ces facteurs de croissance dans la modulation de la régénération épithéliale. Alors que le TGF α et l'EGF stimulent fortement l'étalement cytoplasmique et une activité protrusive non orientée des cellules bordant la blessure, l'HGF coordonne préférentiellement l'élongation de groupements de cellules et la migration directionnelle de la monocouche blessée. Ces résultats démontrent

ainsi qu'une coordination des activités des facteurs de croissance est nécessaire à la progression normale de la réparation épithéliale suivant une blessure.

Dans un deuxième temps, nous avons identifié et caractérisé les voies de signalisation responsables de la régulation de la restitution épithéliale. Nous avons démontré que les activités de ERK1/2 et d'Akt sont rapidement stimulées suivant une blessure des cellules HGE-17. Nous avons également observé que l'inhibition de la PI3K avec le LY294002 atténue fortement la migration cellulaire suivant une blessure, alors que l'inhibition de MEK1 n'exerce aucun effet. Parallèlement, l'addition d'un composé synthétique de phosphatidylinositol (3, 4, 5) triphosphate est suffisante à la stimulation de la migration cellulaire. De plus, nos résultats démontrent que l'activité de pp60c-src et la phosphorylation du récepteur de l'EGF sont requises pour contrôler la restitution épithéliale suivant une blessure. Ainsi, l'induction d'une blessure épithéliale entraîne l'activation rapide de pp60c-src, menant ensuite à la transactivation du récepteur de l'EGF. De façon complémentaire, l'activation du récepteur de l'EGF peut survenir suite à la sécrétion des facteurs de croissance EGF et TGF α dans le milieu de culture. Finalement, cette activation du récepteur de l'EGF est responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation dépendantes de la PI3K et du contrôle de la restitution épithéliale.

Finalement, dans le but de détailler les mécanismes régulateurs des différentes phases de la régénération épithéliale, nous avons adapté un modèle de micro-

blessure épithéliale permettant d'étudier spécifiquement les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'étalement cellulaire. Nous avons d'abord apporté l'évidence que les facteurs de croissance $TGF\alpha$ et EGF jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'étalement cellulaire suivant une micro-blessure. Nos résultats démontrent également que la modulation de l'étalement cellulaire requiert les activités de Src, du récepteur de l'EGF et de la PI3K, alors que l'activation des voies dépendantes de la PI3K semble seulement impliquée dans le contrôle de la migration cellulaire suivant une blessure épithéliale. Finalement, nos données ont suggéré un rôle important de l'intégrine $\alpha3\beta1$ suite à une micro-blessure, au niveau de la formation des lamelles cytoplasmiques.

I- INTRODUCTION

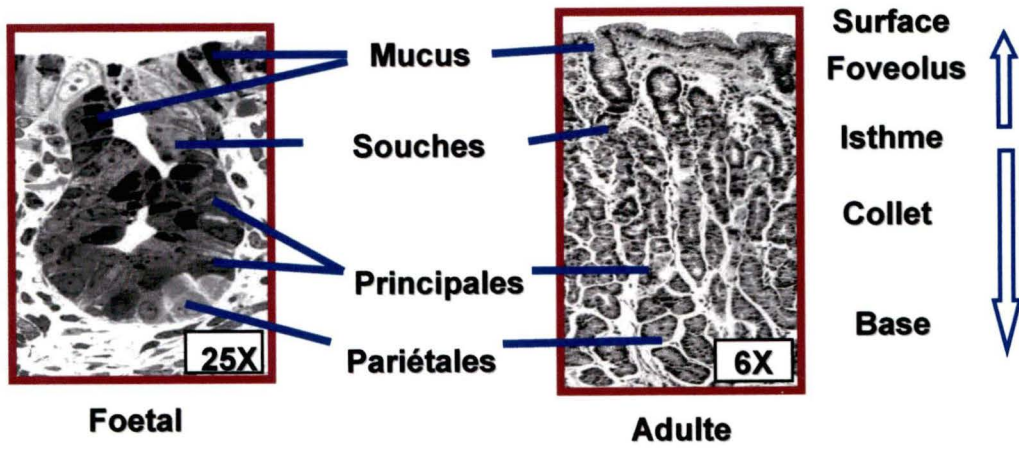
1. Épithélium gastrique

1.1 Histologie des unités fonctionnelles de l'épithélium gastrique

L'unité fonctionnelle de la muqueuse gastrique est composée d'un axe foveolus-glande et est subdivisée en cinq compartiments fonctionnels distincts : l'épithélium de surface, le foveolus, l'isthme, le collet et la base de la glande (Helander, 1981; Karam et Leblond, 1995) (Figure 1). La production des cellules assurant le renouvellement de l'épithélium gastrique est issue de la prolifération des cellules souches pluripotentes localisées au niveau de la région de l'isthme (Rubin et al., 1968; Karam et Leblond, 1993; Karam, 1995). Suivant la division cellulaire, les cellules filles vont entreprendre une migration ascendante ou descendante le long de l'axe foveolus-glande. La décision de s'engager à migrer dans l'une ou l'autre de ces directions influencera directement la différenciation et la détermination cellulaire. D'une part, les cellules entreprenant une migration ascendante vont se différencier en cellules à mucus de surface exprimant la mucine-5 (De Bolos et al., 1995). Pour leur part, les cellules migrant de façon descendante vers la glande vont se différencier en cellules à mucus du collet exprimant la mucine-6 (Byrd et al., 1997; Bartman et al., 1998; Ho et al., 1995), en cellules principales sécrétant de la lipase gastrique et du pepsinogène-5 (Ménard et al., 1995), en cellules pariétales sécrétant de l'acide chlorhydrique (Lorenz et Gordon, 1993) ainsi qu'en cellules endocrines (Arnold et al., 1992).

L'ensemble des travaux effectués dans notre laboratoire a établi que la glande gastrique fœtale humaine dès 15 semaines de gestation est similaire à la structure adulte d'un point de vue morphologique et fonctionnel (Figure 2), à l'exception de la sécrétion acide

Figure 1. Axe foveolus-glande et épithélium gastrique. L'unité fonctionnelle de la muqueuse gastrique est constituée d'un axe foveolus-glande. Au niveau de l'épithélium gastrique, le renouvellement constant des cellules est assuré grâce à un patron de migration bi-directionnelle (ascendante ou descendante). Suite à la division des cellules souches localisées au niveau de l'isthme, les cellules filles progénitrices quittent la zone proliférative et entreprennent soit une migration ascendante (foveolus, surface) pour se différencier en cellules à mucus, soit une migration descendante (collet, glande) pour se différencier en cellules à mucus du collet, principales, pariétales et endocrines. Photographies tirées de Ménard, 2005. Coupes issues d'estomac fœtal humain de 17 semaines (A) et adulte (B).

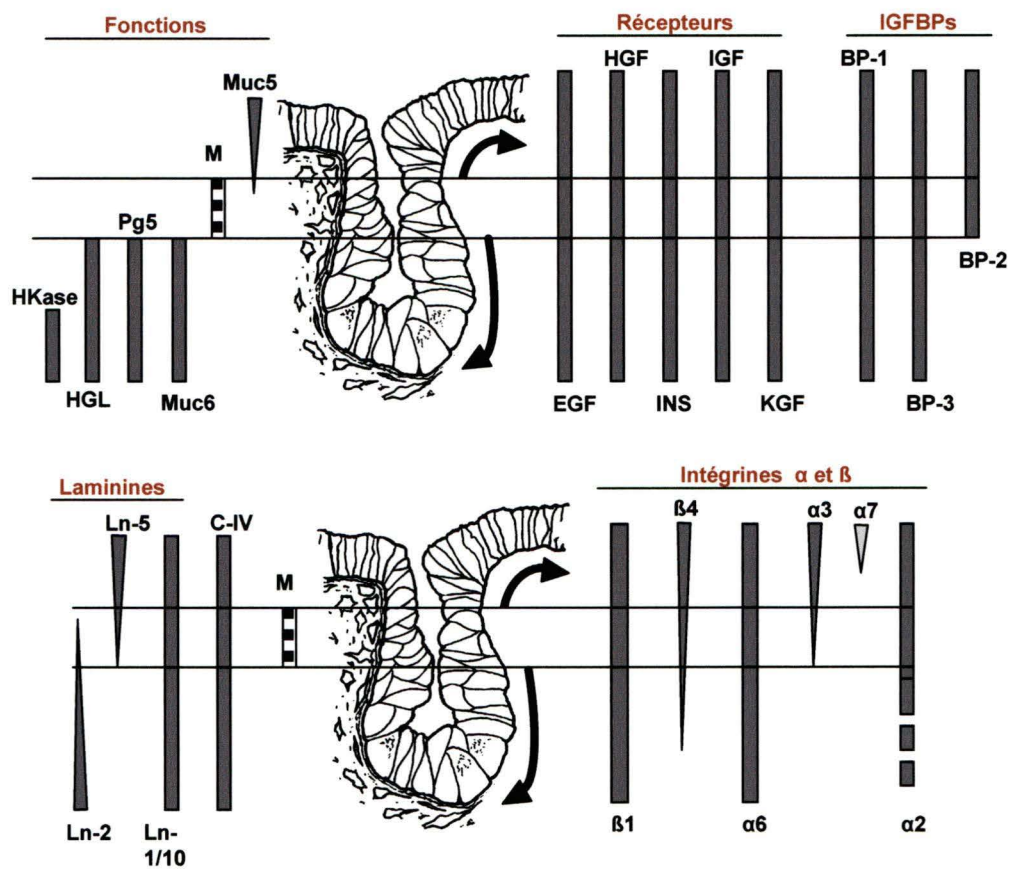


(Ménard, 2004). En effet, 1) tous les compartiments fonctionnels sont bien délimités, 2) tous les types épithéliaux différenciés sont en place, 3) tous les marqueurs fonctionnels sont présents, 4) tous les récepteurs d'hormones et de facteurs de croissance sont retrouvés dans les différents compartiments et 5) les composés de la matrice extracellulaire et les récepteurs de type intégrine sont compartimentalisés (Chailier et Ménard, 1999; Ménard, 1994; Ménard et Arsenault, 1990; Ménard et al., 1995; Tremblay et Ménard, 1996; Tremblay et Ménard, 2001; Chénard et al., 2000; Tremblay et Ménard, 1997; Tremblay et al., 1999; Chailier et al., 2000)

1.2 Mécanismes de défense de l'épithélium gastrique

La fonctionnalité de l'épithélium repose sur une intégrité complète de ses constituants. De plus, pour occuper des fonctions de barrière protectrice, les cellules épithéliales doivent adhérer les unes aux autres pour former un feuillet continu. C'est pourquoi la perte de cellules au niveau de l'épithélium peut s'avérer extrêmement désastreuse pour la muqueuse et pour l'organisme. La barrière de protection de la muqueuse gastrique représente la première ligne de défense contre une variété d'agressions mécaniques, chimiques et inflammatoires (peptidases, alcool, microorganismes, HCl, etc.). Pour être plus précis, le système de défense de la muqueuse fait référence à l'ensemble des facteurs permettant à la muqueuse gastrique de supporter une exposition fréquente à des substances possédant une grande variation de pH, d'osmolarité et de température, sans oublier une exposition à différents agents possédant des propriétés détergentes et aux produits bactériens capables de causer des réactions inflammatoires locales et systémiques (Wallace et Granger, 1996). Le système de défense de la muqueuse gastrique forme un réseau complexe où chacun de ses composants fonctionne de

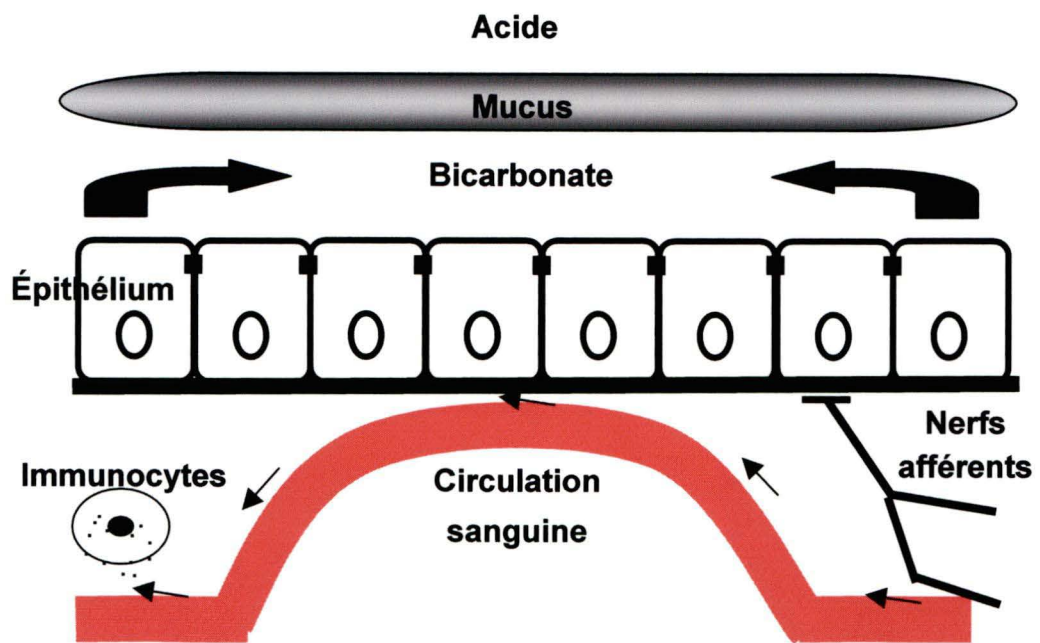
Figure 2. Compartimentalisation histologique et fonctionnelle de l'axe-foveolus-glande de la muqueuse gastrique humaine. L'acquisition d'un phénotype cellulaire spécialisé au cours du développement et son maintien pendant la période adulte dépendent d'interactions complexes des hormones et des facteurs de croissance avec leurs récepteurs et d'interactions avec différentes composantes de la matrice extracellulaire différenciellement distribuées le long de l'axe foveolus-glande. La barre en formes en trait non continu indique l'absence d'expression de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines au niveau des cellules pariétales. Les triangles indiquent une expression décroissante à partir de la base du triangle vers la pointe. EGF : *Epidermal growth factor*, HGF : *Hepatocyte growth factor*, IGF : *Insulin growth factor*, KGF : *Keratinocyte growth factor*, HGL : lipase gastrique humaine, Pg5 : Pepsinogène-5, Muc6 : Mucine-6, M : Mitose, Muc5 : Mucine-5, Ins : Insuline, Ln-2 : laminine-2, Ln-5 : laminine-5, Ln-1/10 : Laminine-1/10, C-IV : Collagène-IV. Tirée de Ménard, 2004.



concert les uns avec les autres. Ce réseau est composé de cinq niveaux différents : 1) les composants extrinsèques à la muqueuse, 2) l'épithélium, 3) la microcirculation et les neurones afférents retrouvés sous l'épithélium, 4) le système immunitaire de la muqueuse et 5) l'habileté de la muqueuse à s'auto-réparer (Figure 3) (Wallace et Granger, 1996).

Le premier niveau du système de défense de la muqueuse gastrique comprend tous les facteurs sécrétés dans la lumière, incluant l'acide luminal, le bicarbonate, le mucus, les immunoglobulines, les phospholipides actifs à la surface et autres substances antibactériennes. Tout d'abord, l'acide gastrique est responsable de tuer les bactéries ingérées par l'individu en plus de limiter l'entrée de matériaux antigéniques dans l'intestin (Gray, 1967). De son côté, le mucus gastrique renferme à peu près 95 % d'eau et 5 % de glycoprotéines. Le mucus constitue une couche stable et relativement épaisse qui est retrouvée de façon adjacente à la muqueuse, ce qui permet aux ions H^+ de diffuser quatre fois plus lentement qu'à travers une couche semblable d'eau stable. Cette vitesse de diffusion contribue à maintenir un gradient d'ions hydrogène entre la lumière de l'estomac et l'épithélium de surface (Garner et al., 1984). De plus, il assure la lubrification des particules alimentaires et sa consistance gélatineuse lui permet de retenir l'eau et le bicarbonate situés à proximité de l'épithélium de surface. Les phospholipides actifs retrouvés à la surface luminale de l'estomac rendent la surface de la muqueuse hydrophobe, ce qui favorise une résistance aux dommages causés par l'acide (Hills et al., 1983). Le second niveau de défense de la muqueuse est l'épithélium en lui-même. En effet, il a été démontré que l'épithélium gastrique est remarquablement résistant aux blessures causées par l'acide luminal (Wallace, 1989; Sanders, 1985).

Figure 3. Mécanismes de défense de la muqueuse gastrique. Le système de défense de la muqueuse gastrique est assuré par : 1) les composantes extrinsèques à la muqueuse, 2) l'épithélium, 3) la microcirculation et les neurones afférents retrouvés sous l'épithélium, 4) le système immunitaire de la muqueuse et 5) l'habileté de la muqueuse à s'auto-réparer. Afin de maximiser la protection de la muqueuse gastrique, chacun des composants de ce système de défense vont agir agit de concert avec les autres. Tirée de Wallace et al., 1996.



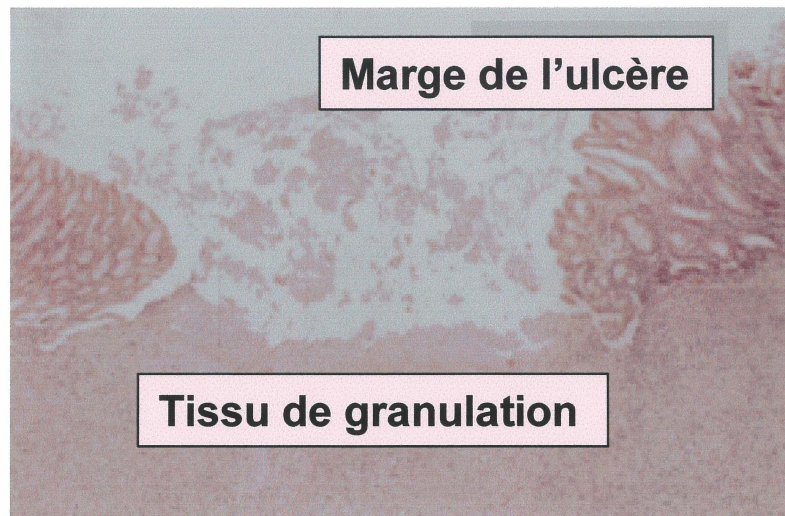
Les jonctions étanches qui unissent les cellules épithéliales de surface bloquent la voie de transport paracellulaire entre les cellules. Ainsi, l'épithélium forme une barrière très serrée qui limite la diffusion passive des substances potentiellement dommageables pour la muqueuse. Le troisième niveau du système de défense comprend la microcirculation et les nerfs sensoriels afférents localisés à l'intérieur de la muqueuse et de la sous-muqueuse. La muqueuse gastrique possède un réseau dense de capillaires. En plus d'alimenter l'épithélium en nutriments et en oxygène, la microcirculation sanguine permet d'enlever, de diluer et de neutraliser les substances toxiques ayant diffusé à l'intérieur de la muqueuse à partir de la lumière (Bruggeman, 1979). La microcirculation permet également de jouer un rôle critique lorsque l'épithélium est endommagé, en créant un microenvironnement propice à la réparation au-dessous du site de la blessure. Le système immunitaire constitue le quatrième niveau de défense de l'estomac et est composé de plusieurs types cellulaires tels que les mastocytes et les macrophages (Wallace et Granger, 1996). Ces différents types cellulaires du système immunitaire sont responsables de détecter l'entrée de matériel étranger à l'intérieur de la muqueuse, permettant ainsi d'orchestrer une réponse inflammatoire appropriée. En dernier lieu, lorsqu'un dommage à la muqueuse est extensif et qu'il s'étend plus profondément que l'épithélium de surface, la muqueuse gastrique fait appel à sa capacité à s'auto-réparer, un processus qui est appelé la régénération épithéliale (Silen et Ito, 1985).

1.3 Ulcération gastrique

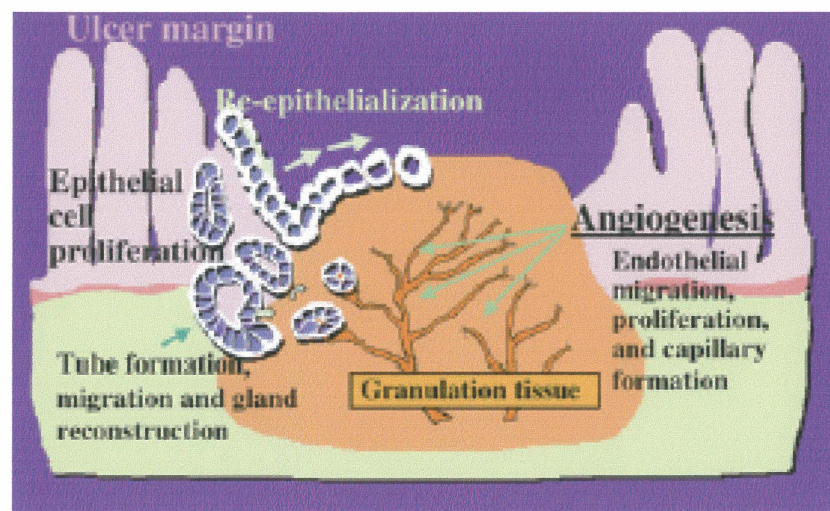
Lorsque tous les niveaux du système de défense de la muqueuse sont surchargés, l'estomac est plus susceptible de développer des ulcérations (Figure 4). Ces ulcérations

Figure 4. L'ulcération gastrique. **A,** Composition histologique d'une ulcération gastrique. Un ulcère gastrique est une défectuosité profonde de la paroi gastrique qui comprend deux composantes majeures : la marge de l'ulcère et le tissu de granulation. **B,** Représentation schématique des mécanismes de réparation d'une ulcération gastrique. La cicatrisation d'un ulcère est un processus complexe qui implique la ré-épithélialisation, l'angiogénèse et la reconstruction des glandes gastriques. Adaptée de Tarnawski et al., 2005.

A.



B.



surviennent suite à un déséquilibre entre les facteurs agressifs présents dans la lumière gastrique et le système de défense de la muqueuse. Par définition, un ulcère est une défectuosité profonde de la paroi gastrique résultant de la nécrose qui s'étend sur l'épaisseur entière de la muqueuse et qui pénètre la *muscularis mucosa*. Aux États-Unis, la prévalence des ulcères gastro-duodénaux est de 7% à 10%, ce qui correspond à un impact économique d'environ 20 milliards de dollars (Isenberg et al., 1995).

Histologiquement, l'ulcération gastrique est composée de deux structures majeures : 1) la marge de l'ulcère qui comprend la muqueuse adjacente à la blessure (composante épithéliale) et 2) le tissu de granulation situé à la base de l'ulcère (composante du tissu conjonctif) (Tarnawski et al., 2000; Tarnawski, 2001; Tarnawski, 2005). La réparation d'une ulcération gastrique est un processus complexe qui nécessite l'interaction d'une variété de tissus et de systèmes cellulaires (Figure 4). Dans un premier temps, pour ce qui est des événements cellulaires qui surviennent au niveau de la composante épithéliale d'un ulcère, la muqueuse va initialement former une zone de réparation (Tarnawski et al., 2000; Tarnawski, 2001; Tarnawski, 2005). Par la suite, les glandes gastriques situées au niveau de cette zone de réparation se dilatent et les cellules épithéliales de ces glandes se dé-différencient, prolifèrent et migrent à partir de la marge de l'ulcère vers le tissu de granulation pour couvrir (ou ré-épithélialiser) la base de l'ulcère (Tarnawski, 2000; Tarnawski, 1990). De plus, les cellules faiblement différenciées provenant des glandes dilatées à la base de la marge de l'ulcère bourgeonnent et envahissent l'intérieur du tissu de granulation, formant ainsi des tubes. Une fois complètement formés, ces tubes migrent vers la lumière de la muqueuse, ce qui permet la reconstruction des glandes gastriques à l'intérieur de la cicatrice

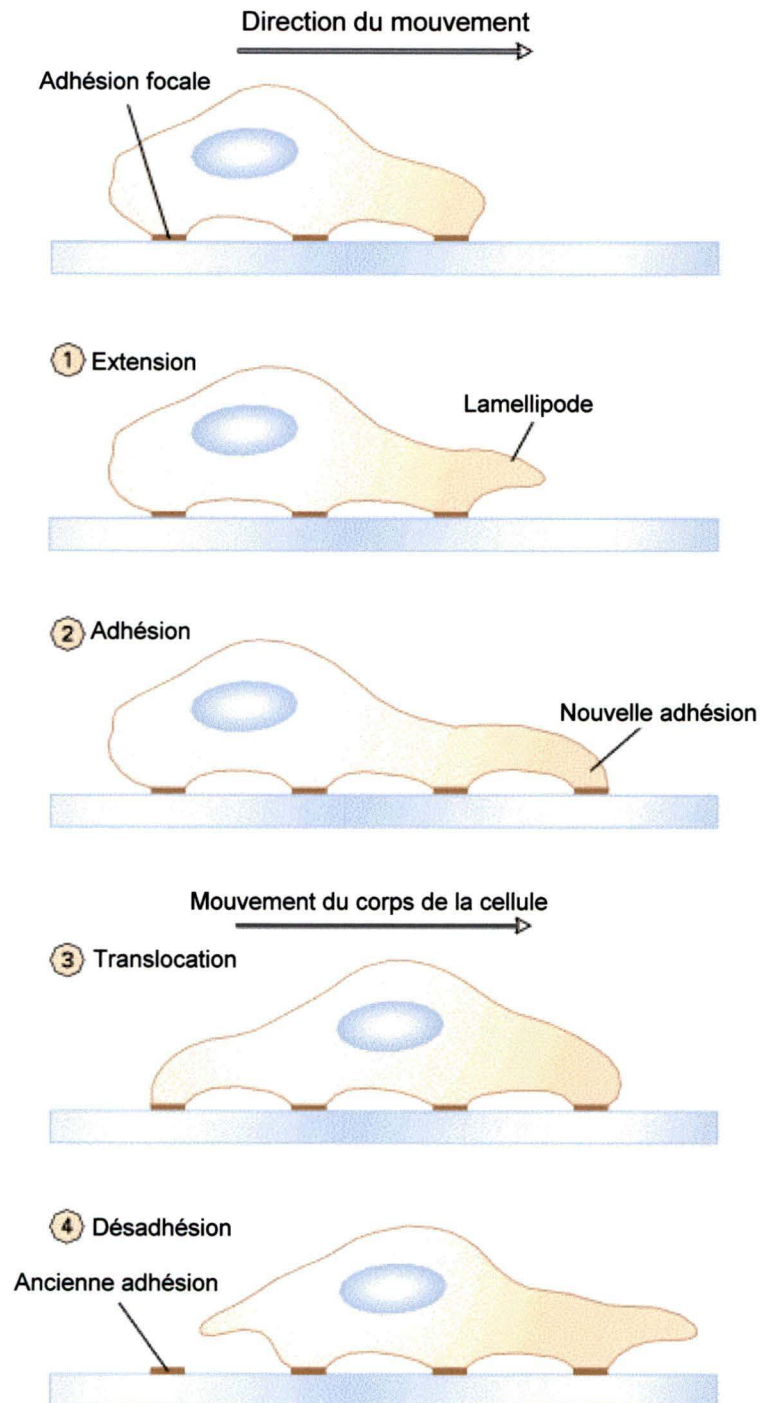
(Tarnawski, 2000; Tarnawski, 1990; Wright et al., 1990). Le second composant crucial à la réparation d'un ulcère est le tissu de granulation. Le tissu de granulation est retrouvé à la base de l'ulcère et est composé des cellules du tissu conjonctif, c'est-à-dire de macrophages, de fibroblastes, de cellules lymphoïdes et de cellules endothéliales. Suivant le développement d'un ulcère, le tissu de granulation subit une croissance rapide, ce qui résulte de la prolifération des cellules du tissu conjonctif et de la génération de nouveaux microvaisseaux par angiogénèse (Tarnawski et al., 2000; Tarnawski, 2005). De plus, tout au long du processus de réparation de l'ulcère, le tissu de granulation est remodelé continuellement et subit de nombreux changements au niveau de sa composition cellulaire. Initialement, les cellules inflammatoires et les macrophages sont retrouvés en abondance alors que dans les stages tardifs de la réparation, ce sont plutôt les fibroblastes qui prédominent. Le rôle principal du tissu de granulation consiste à fournir les cellules du tissu conjonctif responsables de restorer la lamina propria en plus de fournir les microvaisseaux nécessaires à la restauration du réseau microvasculaire à l'intérieur de la cicatrice de la muqueuse (Tarnawski et al., 2000; Tarnawski, 2001; Tarnawski, 2005). En effet, la formation d'un réseau capillaire par angiogénèse facilite la livraison de nutriments et d'oxygène à la base de l'ulcère, ce qui est crucial pour le processus de réparation. Ainsi, le processus de réparation d'un ulcère implique une interaction dynamique entre la composante épithéliale de la muqueuse située à la marge de la blessure et le tissu conjonctif localisé au niveau du tissu de granulation. L'ulcération gastrique est donc un très bon exemple de pathologie où le processus de régénération épithéliale va jouer un rôle fondamental.

2. Migration cellulaire

La migration est un processus cellulaire central dans l'homéostasie de plusieurs processus biologiques incluant l'embryogenèse, la réponse inflammatoire, la réparation de tissu et la régénération. Celle-ci contribue également au développement ou à la progression de divers processus pathologiques tels que les maladies vasculaires, les maladies inflammatoires chroniques, le cancer et les métastases. Conséquemment, une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux contrôlant la migration cellulaire est essentielle pour favoriser le développement de nouvelles thérapies permettant de traiter les conditions pathologiques associées avec une motilité cellulaire défectueuse. La compréhension de la migration cellulaire est d'ailleurs devenue depuis quelques années un des domaines émergents de la biotechnologie qui se concentre principalement sur l'étude des transplantations cellulaires et sur la fabrication de tissus artificiels.

Le comportement migratoire des cellules nécessite la communication de cellules individuelles avec leur environnement et est également dépendant de l'intégration de divers signaux dérivés de la matrice extracellulaire et d'interactions avec les cellules adjacentes. Depuis les quinze dernières années, d'énormes progrès ont été réalisés dans la compréhension de la complexité et des subtilités de la régulation de la migration cellulaire. Plusieurs études effectuées principalement sur des fibroblastes ont permis de démontrer que les cellules induites à migrer vont subir une série de changements morphologiques qui peuvent être visualisés comme un cycle (Figure 5) (Bailly et Condeelis, 2002). Tout d'abord, le cycle de la motilité cellulaire est initié par des signaux externes qui sont perçus et transmis à l'intérieur des cellules par des protéines

Figure 5. Cycle de motilité cellulaire. Étape 1. Le mouvement débute avec l'extension d'un ou plusieurs lamellipodes à la surface des cellules en migration. Étape 2. Les complexes d'adhésion focaux s'accumulent à l'extrémité de certains lamellipodes, permettant l'ancrage du lamellipode au substrat. Étape 3. Suivant l'ancrage de la protrusion cytoplasmique au substrat, la contraction des filaments d'acto-myosine vont permettre de tirer la cellule vers le front de migration. Étape 4. Le cycle de la motilité cellulaire est complété par le relâchement des complexes d'adhésion situés à l'arrière de la cellule, induisant subséquemment la rétraction de la queue cytoplasmique de la cellule en migration. Adaptée de Alberts et al. 2002.



réceptrices localisées au niveau de la membrane cellulaire. En réponse à ces signaux, la cellule induit une polymérisation de son cytosquelette d'actine, ce qui permet le déploiement de protrusions membranaires (lamellipode ou filopode) à la surface de la cellule (Pollard et Borisy, 2003). Une fois la direction du mouvement établie, la machinerie responsable de permettre le mouvement de la cellule s'assemble tout en tenant compte de la direction de la migration (Bailly et Condeelis, 2002). Par la suite, les complexes d'adhésion requis pour la traction de la cellule s'accumulent à l'extrémité de la protrusion, ce qui permet l'ancrage de la protrusion au substrat. Suivant l'ancrage de la protrusion au substrat, les filaments d'acto-myosine contractent au front de la cellule et tirent le corps de la cellule vers la protrusion. Finalement, le relâchement des complexes d'adhésion à l'arrière de la cellule et la rétraction de la queue cytoplasmique de la cellule complètent le cycle de la motilité cellulaire (Bailly et Condeelis, 2002). Il est important de noter que la coordination de ce processus complexe est très finement régulée et qu'il repose sur une multitude de protéines qui vont servir à distinguer l'arrière de l'avant de la cellule.

Chez l'espèce humaine, la plupart des types cellulaires possèdent la capacité de se déplacer sur ou à travers un substrat. Toutefois, cette capacité de locomotion est normalement réprimée, à l'exception de certains types cellulaires tels que les fibroblastes, les neutrophiles et les leukocytes. En effet, la plupart des cellules sont confinées à leur tissu par des interactions avec les cellules voisines et avec certains éléments de la matrice extracellulaire, ce qui est le cas par exemple de l'épithélium gastrique. Alors que les composants moléculaires impliqués dans le contrôle de la migration de cellules individuelles telles que les fibroblastes sont identifiés à une vitesse

impressionnante (Onishi et al., 2007; Bindschadler et McGrath, 2007), la migration coordonnée de feuillets épithéliaux cohérents dans le cadre de la régénération épithéliale commence à peine à être élucidée.

3. Régénération épithéliale

3.1 Définition et description de la régénération épithéliale

L'histologie des ulcérations gastriques illustre bien à quel point il est fondamental de rétablir le plus rapidement possible la continuité de la barrière épithéliale de la muqueuse gastrique afin de limiter le plus possible les dommages causés après toute forme de blessure (Figure 4). Tel que mentionné précédemment, la muqueuse gastrique possède une fonction spécialisée de réparation qu'on appelle régénération épithéliale. Au niveau du tube digestif, il a été démontré que la régénération épithéliale repose sur une activation ordonnée d'événements cellulaires comprenant trois mécanismes distincts (Figure 6) (Lacy, 1995; Tarnawski et al., 1995). Tout d'abord, les cellules épithéliales bordant la blessure s'allongent et forment une marge réfringente afin de préserver l'intégrité de l'épithélium adjacent. Par la suite, les cellules viables à la marge de la blessure vont subir une première transformation morphologique évoquant une dé-différenciation cellulaire qui sera caractérisée par un étalement cytoplasmique rapide des cellules et une dissociation partielle des jonctions cellule-cellule. Dans le cas d'une micro-blessure, c'est-à-dire d'une atteinte superficielle à la muqueuse, cette première transformation morphologique sera suffisante pour réparer la blessure en quelques heures seulement. Cependant, si le dommage est plus important, les cellules viables à la marge de la blessure vont migrer à partir des zones adjacentes à la surface blessée pour recouvrir le plus rapidement possible la zone dénudée. Ce processus, qui

Figure 6. Phases de la régénération épithéliale gastrique. Suivant une blessure épithéliale, la continuité de l'épithélium de surface est rétablie par au moins trois mécanismes distincts. Premièrement, les cellules épithéliales bordant la blessure s'allongent et forment une marge réfringente afin de préserver l'intégrité de l'épithélium adjacent. Les cellules de la marge de la blessure subissent ensuite une transformation morphologique qui évoque une dé-différenciation : leur cytoplasme s'étale rapidement et la cadhérine-E commence à se dissocier des contacts cellule-cellule. Dans le cas d'une micro-blessure, cette réponse est suffisante pour réparer le feuillet épithélial en quelques heures seulement. Dans le cas d'une blessure plus importante, les cellules localisées à la marge de la blessure subissent une nouvelle transformation morphologique leur permettant d'être induites à migrer (formation de lamellipodes, réorganisation cytosquelettique). Ces deux phases, exemptes de prolifération cellulaire et de réponse inflammatoire extensive, représentent le processus de restitution épithéliale. Cette phase migratoire intensive est par la suite suivie d'une phase de prolifération cellulaire dans le but de reconstituer le groupe de cellules perdues. Finalement, la différenciation et la maturation des cellules épithéliales indifférenciées sont stimulées pour maintenir les fonctions épithéliales gastriques. L'ensemble de ces phases constitue le processus de régénération épithéliale gastrique.

- ① Au site de la blessure, les cellules endommagées meurent et desquament.
- ② Cellules viables à la marge de la blessure : (Quelques minutes à 6 h)
Le phénotype épithélial est modifié.



Étalement

- Étalement cytoplasmique
- Dissociation partielle des jonctions cellule-cellule
- Dé-différenciation

- ③ Formation de structures migratoires. (6 h à 12 h)
• Formation de lamellipodes



Lamellipodes

- ④ Augmentation de la densité cellulaire par prolifération compensatoire. (24h à 48h)

R
e
s
t
i
t
u
t
i
o
n

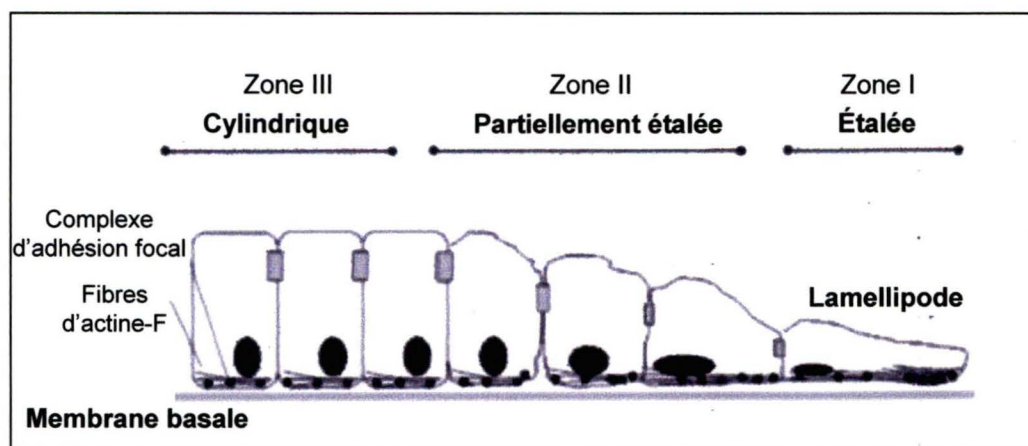
R
é
g
é
n
é
r
a
t
i
o
n

a été observé *in vivo* et *in vitro* est appelé restitution épithéliale. *In vivo*, la restitution épithéliale constitue le mécanisme initial responsable de prévenir un dommage profond à la muqueuse en rétablissant la continuité épithéliale en quelques minutes ou en quelques heures seulement. Finalement, une fois la continuité épithéliale rétablie, les populations de cellules perdues sont remplacées grâce à un processus de prolifération compensatoire qui débute de 12 à 16 heures suivant la blessure et qui prend de un à plusieurs jours à se compléter. Il est bien important de comprendre que la division de la régénération épithéliale en trois phases distinctes (étalement, migration, prolifération) constitue une délimitation simpliste et artificielle. En effet, *in vivo*, l'ensemble de ces phases se chevauche et survient simultanément. Néanmoins, ce modèle simple permet de mieux comprendre et de mieux visualiser la physiologie de la régénération. La régénération épithéliale est un processus essentiel à la réparation des blessures ou des ulcères de l'estomac puisque sans la restauration d'une barrière épithéliale continue et cruciale pour la protection du tissu de granulation, la blessure ou l'ulcère est incapable de se réparer (Tarnawski et al., 2000; Tarnawski et al., 2001).

Une étude *in vitro* de restitution épithéliale intestinale effectuée sur des cellules épithéliales de côlon T84 et Caco-2 a conduit à la caractérisation et à la distinction de trois zones morphologiques dans les cellules épithéliales en restitution (Hopkins et al., 2004). Tel qu'illustré à la Figure 7, à proximité de la marge de la blessure, les cellules de la zone I possèdent une morphologie pleinement étalée et présentent des extensions cellulaires proéminentes (lamellipodes ou filopodes). Par la suite, de façon adjacente à la zone I, au niveau de la zone II, on retrouve une région de cellules partiellement étalées comprenant trois à quatre cellules de diamètre à l'arrière de la blessure.

Figure 7. Représentation schématique des 3 zones morphologiques observées dans les monocouches de cellules épithéliales en migration suivant une blessure.

Zone I : À la marge de la blessure, les cellules sont complètement étalées et présentent de structures migratoires (lamellipodes) à leur surface. Zone II : Zone intermédiaire de cellules partiellement étalées. Zone III : Les cellules de la monocouche adjacente à la blessure sont cylindriques et polarisées, exactement comme les cellules retrouvées au niveau d'une monocouche épithéliale confluente. Adaptée de Hopkins et al., 2004.



Finalement, les cellules de la zone III, situées à l'arrière de la zone II, sont hautes, cylindriques et polarisées et possèdent une morphologie similaire à celle retrouvée au niveau des cellules stationnaires. Chacune des cellules retrouvées spécifiquement dans chacune de ces zones va apporter sa contribution particulière pour coordonner le processus de régénération épithéliale.

D'autre part, une étude utilisant les colonocytes cancéreux T84 a permis la mise au point d'un nouveau modèle *in vitro* de micro-blessure (Lotz et al., 2000). En effet, les expériences avec les cellules T84 ont révélé que l'occlusion complète d'une micro-blessure (<300 μ M) implique uniquement le phénomène d'étalement cellulaire et l'absence de migration (formation de lamellipodes). L'analyse des événements morphologiques impliqués dans la fermeture d'une micro-blessure au niveau d'un feuillet épithélial de cellules T84 a permis la description d'une séquence d'événements morphologiques bien précise. Tout d'abord, la marge de la blessure va se rétracter pendant environ 10 minutes, entraînant une augmentation de la surface dénudée d'environ 14%. Suivant la rétraction initiale, les cellules blessées entourant la blessure vont s'aligner et former une marge réfringente contenant un anneau continu d'actine-fibrillaire. Par la suite, les cellules bordant la blessure vont former des protrusions appelées lamelles. Il est important de noter que les lamelles sont des extensions cytoplasmiques très différentes des lamellipodes. En effet, alors que les lamellipodes sont des structures migratoires hautement dynamiques, les lamelles sont quant à elles la conséquence de l'affaissement du cytoplasme d'une cellule en étalement (Etienne-Manneville et al., 2004). La formation de l'anneau d'actine et des lamelles va générer

une force contractile qui induira l'allongement subséquent et l'alignement des cellules situées à l'arrière de la blessure. Finalement, cet allongement cellulaire permettra aux cellules adjacentes de la monocouche d'augmenter leur surface d'environ deux fois et servira à couvrir une surface de la zone dénudée additionnelle à celle procurée par la formation des lamelles.

3.2 Rôle des facteurs de croissance dans la régulation de la régénération épithéliale gastrique *in vivo*

La littérature a très bien établi que les stimuli majeurs de la régénération épithéliale durant la réparation des ulcères gastriques sont majoritairement des facteurs de croissance (Tarnawski et al., 2000; Tarnawski et al., 2001). En effet, en plus des facteurs de croissance produits par les plaquettes, les macrophages et le tissu de blessé, l'ulcération active également dans la muqueuse à la marge de la blessure des gènes encodant pour de multiples facteurs de croissance et leurs récepteurs et ce, de façon très synchronisée dans le temps (Wong et al., 2000; Tarnawski, 2001). En effet, Wong et collaborateurs ont analysé l'expression séquentielle d'une variété de gènes durant la réparation d'ulcères gastriques et sur la base de ces analyses, trois catégories de gènes ont été établies : les gènes de réponse immédiate, intermédiaire et tardive (Figure 8). Tout d'abord, les gènes de réponse immédiate tels que EGFR, c-fos, c-jun, egr-1, SP-1 et TFF-2/SP sont activés rapidement suivant la formation d'un ulcère, c'est-à-dire de 30 minutes à 2 heures. Par la suite, les gènes de réponse intermédiaire encodant pour les facteurs de croissance EGF, bFGF, PDGF et VEGF sont activés de six heures à deux jours suivant le développement de l'ulcère. Finalement, les gènes encodant pour HGF, ITF et HGFR/c-met font partie de la catégorie des gènes de la

Figure 8. Expression temporelle de différents gènes durant la réparation d'un ulcère gastrique. Les expériences d'hybridation *in situ* réalisées sur des spécimens d'ulcères suggèrent que l'expression de certains gènes associés aux facteurs de croissance et à leurs récepteurs (EGF, EGFR, HGF, c-met, trefoil peptides, gènes de réponse immédiate ...) est modulée de façon différentielle en fonction du temps au cours de la régénération épithéliale. L'analyse de l'expression de différents gènes suivant l'induction d'un ulcère expérimental a mené à la distinction de trois catégories de gènes : Précoce (30 minutes-2 heures), intermédiaire (6 heures-2 jours) et tardif (7-14 jours). Tirée et modifiée de Tarnawski et al., 2001.

	Précocé (30 min -2 hrs)	Intermédiaire (6 hrs – 2 jrs)	Tardif (7 à 14 jrs)
U L C È R E	EGF-R, c-fos, c-jun, egr-1, Sp-1, TFF-2SP, c-met	EGF, bFGF, PDGF, VEGF, TGF α	HGF, ITF, c-met

réponse tardive et sont activés de deux jours à quatorze jours suivant la formation de la blessure. Ainsi, il semble que chaque catégorie de gènes joue un rôle particulier dans le processus de réparation puisqu'ils sont exprimés de façon ordonnée pour agir comme un système intégré permettant d'assurer une réparation appropriée de la muqueuse blessée. Toutefois, tel que mentionné précédemment, l'approche *in vivo* ne permet pas de discerner clairement les différents événements cellulaires qui composent la régénération épithéliale. C'est pourquoi quelques groupes de recherche se sont tournés vers des modèles *in vitro* de monocouches blessées de cellules épithéliales.

3.3 Rôle des facteurs de croissance dans la régulation de la régénération épithéliale gastro-intestinale *in vitro*

Pour étudier la régénération et la restitution épithéliales *in vitro* (Kato et al., 1999; Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1993), le groupe de Podolsky a élaboré une méthode expérimentale de blessure utilisant une lame de rasoir. À l'atteinte de la confluence, les monocouches épithéliales sont blessées au moyen d'une lame de rasoir (environ 13mm-14mm de large), rincées et incubées en présence de différents régulateurs (facteurs de croissance, cytokines...) dans un milieu réduit en sérum (FBS 0.1%). La régénération totale est quantifiée par le décompte du nombre de cellules ayant traversé la marge de la blessure. De plus, afin de disséquer l'implication des régulateurs durant la phase initiale de la régénération, i.e. la restitution, les monocouches blessées sont incubées en présence d'hydroxyurée ou de mitomycine C, deux inhibiteurs pharmacologiques permettant de bloquer la prolifération au pied de la phase S du cycle cellulaire.

Notre connaissance actuelle des facteurs de croissance impliqués dans la modulation de la régénération épithéliale intestinale *in vitro* provient essentiellement d'expériences réalisées avec les cellules épithéliales intestinales de rat IEC-6 (Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1993) ou les lignées dérivées d'adénocarcinome de côlon humain telles que Caco-2, T84, Ls174t et cloneA (Basson et al., 1992; Buchanan et al., 2003; O'Connor et Mercurio, 2001). Les études de restitution épithéliale intestinale dans lesquelles la prolifération cellulaire avait été inhibée ont démontré que plusieurs facteurs de croissance et cytokines sont capables de stimuler la restitution, incluant $TGF\alpha$, EGF, $TGF\beta$, HGF, FGF, PDGF, IL-1, IL-2 et IFN- γ , suggérant ainsi une possible redondance fonctionnelle. De plus, la stimulation de la restitution épithéliale intestinale par ces facteurs de croissance et cytokines est dépendante de la voie du $TGF\beta$ puisque l'addition d'un anticorps neutralisant anti- $TGF\beta$ pan-spécifique dans des monocouches de cellules IEC-6 blessées a complètement bloqué la stimulation de la migration cellulaire par les différents régulateurs (Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1993).

Pour ce qui est de la muqueuse gastrique, seulement trois études ont analysé l'effet des facteurs de croissance et cytokines sur la restitution des cellules épithéliales et les résultats sont résumés à la Figure 9. Des essais de blessure effectués sur des cultures primaires de cellules épithéliales gastriques de lapin, de rat et de chien cultivées sur une matrice de collagène ont permis de démontrer un effet stimulant des facteurs de croissance, hormones et cytokines $TGF\alpha$, EGF, HGF, IGF-I, FGF, insuline, bFGF, IL-1 et IL-2 sur la migration (Watanabe et al., 1995; Maehiro et al., 1997; Kobayashi et al., 1996; Watanabe et al., 1995; Watanabe et al., 1994; Kato et al., 1999; Hollande et al.,

Figure 9. Résumé de l'effet de différents facteurs de croissance exogènes dans la modulation de la restitution épithéliale gastrique *in vitro*. Les modèles cellulaires de restitution épithéliale gastrique *in vitro* ont permis de vérifier la capacité de réponse de l'épithélium gastrique à différents facteurs de croissance exogènes suivant une blessure. - : absence de réponse migratoire, ++ : stimulation significative de la migration cellulaire, +++ : très forte stimulation de la migration cellulaire.

Modulateurs	Estomac	Références
TNFα	-	1
PDGF	++	2
TGFα	+++	1,2
EGF	+++	1,2
IL-1β	++	1
IFNγ	-	1
HGF	+++	2,3
Trefoil peptides	++	1
TGFβ	-	1,2
Insuline	++	2
IL-1α	-	1
IL-6	-	1
IGF-I	++	1,2
bFGF	- et ++	1,2

1. Kato, K. et al. 1999 (Chien)
2. Watanabe, S. et al. 2000 (Lapin)
3. Hollande, F. et al. 2001 (Lignée souris)

2001). Toutefois, contrairement à ce qui a été rapporté dans le modèle intestinal, le facteur de croissance TGF β 1 n'a pas accéléré la migration des cellules épithéliales gastriques de chien et de lapin (Kobayashi et al., 1996; Kato et al., 1999). De plus, l'addition d'un anticorps neutralisant anti-TGF β n'a pas atténué la réponse positive induite par le TGF β . Cette différence fondamentale a été attribuée à une différence d'espèce (rat vs chien), de tissu (intestin vs estomac) ou de modèle expérimental (lignée immortalisée vs culture primaire) (Kato et al., 1999).

4. Signalisation intracellulaire associée à la migration cellulaire

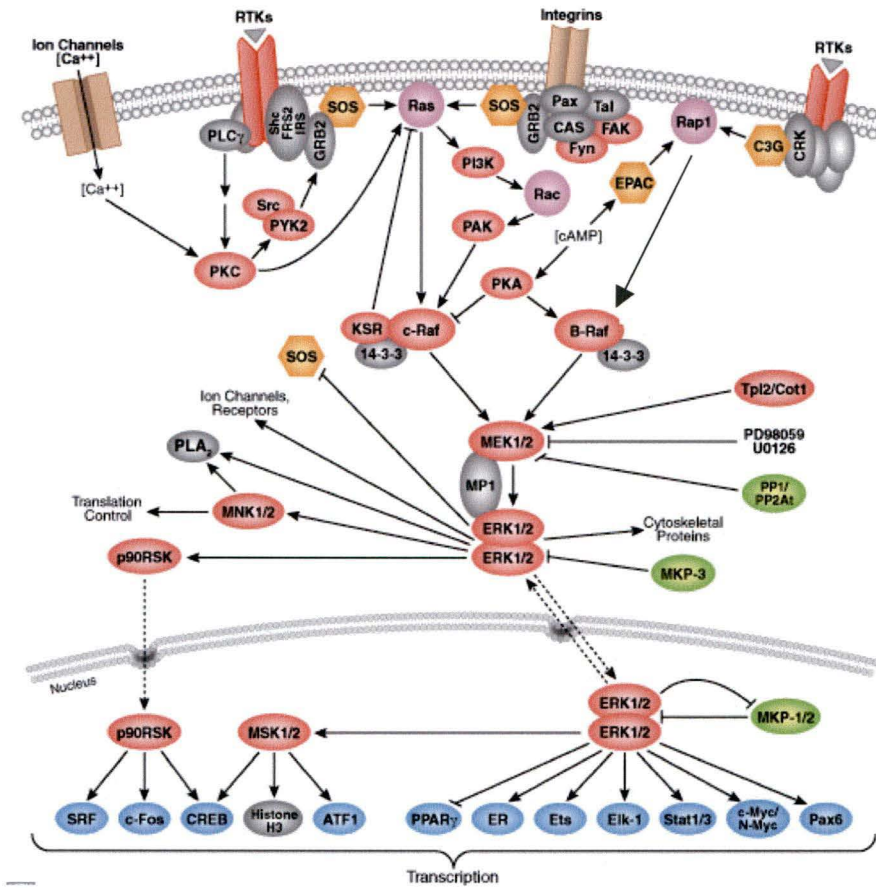
Les cellules des organismes vivants ont la capacité de détecter et d'intégrer les signaux chimiques et physiques de l'environnement, pour par la suite les transmettre à des molécules effectrices qui déclenchent une réponse homéostatique appropriée à l'intérieur de la cellule (croissance et prolifération cellulaire, différenciation, morphologie, migration, contrôle de différentes fonctions spécialisées). Par exemple, il est bien accepté que les facteurs de croissance et leurs récepteurs exercent leurs effets sur la modulation de la migration cellulaire en stimulant une variété de voies de signalisation intracellulaire, telles que les MAPKs Erk1/2, la PI3K, la p70S6K et les tyrosines kinases Src. Au cours de la dernière décennie, la compréhension des mécanismes moléculaires responsables des voies de signalisation cellulaire est devenue un domaine majeur de recherche active.

4.1 Voie de signalisation des MAPK Erk1/2

Les *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) sont une famille de sérine/thréonine kinases hautement conservées chez les eucaryotes. Les MAPKs jouent un rôle central dans la transmission de signaux extracellulaires vers le cytoplasme et le noyau, leur permettant ainsi de moduler différents processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la migration (Aliaga et al., 1999; Brunet et Poysségur, 1999; Chang et Karin, 2001). Les MAPKs sont organisées en 3 différents modules de kinases : une MAPK, une MAPK kinase (MAPKK, MKK ou MEK) et une MAPK kinase kinase (ou MEKK) (English et al., 1999; Chang et Karin, 2001). La transmission du signal à travers le module est accomplie par une cascade de phosphorylation hiérarchique partant d'une MAPKKK jusqu'à la MAPK. Les mammifères expriment au moins 3 différents modules de MAPKs, dont les plus caractérisés sont les *extracellular signal-related kinases* (Erk1/2), les protéines kinases p38 (α , β , γ , δ) et les *Jun amino-terminal kinases* (JNK1/2/3).

Chez les mammifères, les MAPKs Erk1/2 sont exprimées de façon ubiquitaire et sont regroupées en un seul module MAPK commun (Ahn et al., 1990). La transmission du signal à travers le module Erk1/2 est initiée par la phosphorylation des MAPKK MEK1/2 par la MAPKKK Raf, ce qui induit une double phosphorylation sur résidus thréonine et tyrosine et qui permet une activation subséquente des kinases Erk1/2 (Figure 10). (Chang et Karin, 2001; Payne et al., 1991; Zhang et al., 1995; Doza et al., 1995; Khokhlatchev et al., 1997). Les MAPK Erk1/2 ainsi que leurs activateurs en amont MEK1/2 sont stimulés par des récepteurs à tyrosine kinase (récepteurs de facteurs de croissance), des récepteurs hétéro-dimériques couplés aux protéines G ou des

Figure 10. La voie de signalisation MAPK ERK1/2. Les MAPKs ERK1/2 sont une famille de sérine/protéine kinases hautement conservée chez les eucaryotes et jouant un rôle central dans la transmission de signaux vers le cytoplasme et le noyau. Les MAPKs ERK1/2 sont phosphorylées et activées sur résidus thréonine et tyrosine par les MAPKKs MEK1/2, qui à leur tour sont phosphorylées et activées par les MAPKKK (Raf). Une fois activées, les MAPKs ERK1/2 peuvent soit phosphoryler et activer une panoplie de cibles au niveau du cytoplasme de la cellule, soit transloquer au noyau où elles phosphorylent divers facteurs de transcription. Tirée de www.cellsignal.com.



récepteurs de cytokines (révisé dans Hunter, 1995). Une fois activées, les MAPKs Erk1/2 peuvent transloquer au noyau où elles phosphorylent divers facteurs de transcription tels que Elk-1, ATF-2 et c-Jun (Marais et al., 1993; Pulverer et al., 1991). L'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation MEK/Erk est possible par un traitement avec l'inhibiteur PD98059 (Alessi et al., 1995). En se liant à MAPK kinase 1 (MKK1 ou MEK1), le PD98059 prévient l'activation de la protéine par des protéines kinases en amont telles que Raf. Comme les seuls substrats connus de MEK1 sont Erk1/2, l'inhibition de MEK1 par le PD98059 prévient l'activation subséquente de ces kinases.

4.1.1 Rôle des Erk1/2 MAPK dans la régulation de la migration cellulaire

Des études *in vivo* effectuées sur des ulcères gastriques induits chez le rat ont démontré que l'ulcération induit une surexpression du facteur de croissance EGF et de son récepteur EGFR dans les cellules épithéliales localisées à la marge de l'ulcère (Tarnawski et al., 1992). De plus, des analyses subséquentes ont permis de déterminer que la réparation de la composante épithéliale des ulcères implique une activation de la voie de signalisation EGFR-MAPK Erk1/2, ce qui inclus une augmentation dramatique (440-900%) de l'activité et des niveaux de phosphorylation de Erk1/2 (Pai et al., 1998; Tarnawski et al., 1998a; Pai et al., 1999; Tarnawski et al., 1998b). De plus, une étude *in vitro* de restitution épithéliale intestinale a rapporté une activation rapide des MAPKs Erk1/2 suivant une blessure dans les cellules IEC-6, suggérant que la transduction de signal initiée par une blessure est activée en partie par la cascade de signalisation Erk/MAPK (Dieckgraefe et al., 1997).

4.2 Voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)





Les membres de la famille PI3K sont des enzymes hétéro-dimériques de type lipide kinase composées d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique. La famille de la PI3K est divisée en trois classes distinctes (I, II, III) et chacune de ces classes diffère en fonction des mécanismes d'activation par les agonistes extracellulaires, la spécificité du substrat et la distribution cellulaire ou tissulaire (Figure 11). Les PI3K sont impliquées dans le contrôle d'une variété de processus cellulaires tels que la survie, la croissance et la transformation, la différenciation, la signalisation de l'insuline et la motilité (Révisé dans Vanahasebroeck et Waterfield, 1999).

Les PI3K de classe I sont activées par une variété de stimuli, incluant les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase et certaines protéines adaptatrices. Les PI3K de classe I sont composées d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. La sous-unité p85 sert de protéine adaptatrice et médie le recrutement de l'enzyme au niveau de différents récepteurs de facteurs de croissance phosphorylés sur résidus tyrosine, permettant ainsi l'activation allostérique de la sous-unité p110. La liaison de deux domaines SH2 des sous-unités régulatrices est également nécessaire à la pleine activation de l'enzyme (Carpenter et al., 1993). Une fois activée, la PI3K catalyse la phosphorylation des phosphoinositides en position D3 de l'anneau inositol, générant principalement les produits lipidiques phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PtdIns (3,4,5) P₃). Cette production de PtdIns (3,4,5) P₃ permet le recrutement, l'ancrage à la membrane et l'activation subséquente d'un sous-groupe de protéines contenant un domaine conservé d'homologie à la pleckstrine (PH) telles que les sérine/thréonine kinases PDK1, Akt, p70S6K et les petites protéines G de la famille

Figure 11. La voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). A, La famille de la PI3K est divisée en 3 classes : I, II, III. Chacune des 3 classes de la PI3K diffère en fonction de la structure, de la spécificité des substrats et des mécanismes de régulation par les agonistes cellulaires. Tirée de Vanhaesebroeck et Waterfield, 1999. B, Résumé de principales voies de signalisation initiées par le produit lipidique majeur de la PI3K, $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ et impliquées dans le contrôle de la migration cellulaire.

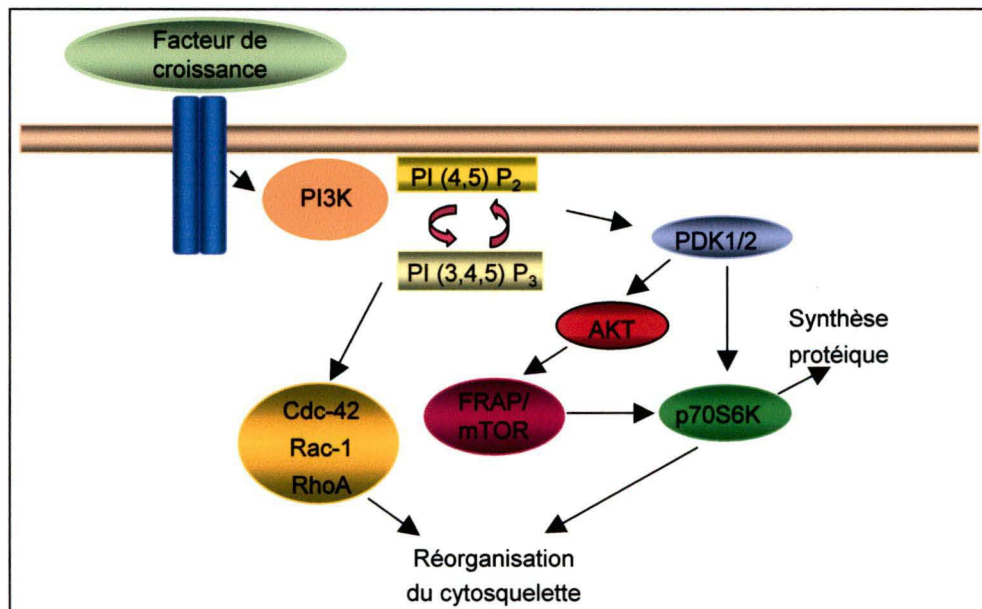
A.

Mammalian PI3Ks

Class	Structural features of catalytic subunits	Subunits		Regulation	Lipid substrates	
		Catalytic	Adaptor		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
I		p110 α , β , δ	p85 α , p85 β , p55 γ	Tyr Kinases & Ras	PtdIns PtdIns(4)P PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(4,5)P ₂
		p110 γ	p101	heterotrimeric G proteins & Ras		
II		PI3K-C2 α , β , δ	?	Tyr kinases? heterotrimeric G proteins? (not Ras)	PtdIns PtdIns(4)P [PtdIns(4,5)P ₂]	?
III		Vps34p analogues	p150	Constitutive?	PtdIns	PtdIns

○ adaptor-binding ◆ Ras-binding ○ C2 ■ PIK ● kinase core domain

B.



Rho (RhoA, Rac-1, Cdc-42). Il est également possible d'inhiber l'activité de la PI3K en utilisant l'inhibiteur pharmacologique LY294002, un inhibiteur compétitif du site de liaison de l'ATP qui se lie à la sous-unité p110 de la PI3K (Vlahos et al., 1994). Les PI3K de classe II sont de larges protéines (170-210 kDa) qui possèdent un domaine catalytique ayant 45-50% d'homologie avec les PI3K de classe I (Cantrell, 2001). Les PI3K de classe II phosphorylent *in vitro* préférentiellement les PtdIns et les PtdIns (4) P. Cependant, *in vivo*, leurs fonctions n'ont pas encore été définies. De plus, jusqu'à présent, il n'a pas été possible de déterminer si cette classe d'enzyme peut-être activée par des stimuli extracellulaires. Enfin, les PI3K de classe III sont également peu caractérisées. Cependant, des études suggèrent que ces enzymes pourraient être impliquées dans la régulation des vésicules de transport (Di Paolo et De Camilli, 2006).

4.2.1 La sérine/thréonine kinase Akt

La sérine/thréonine kinase Akt est l'effecteur de la PI3K le mieux caractérisé dans la littérature. D'ailleurs, l'activité intrinsèque de la PI3K est généralement déterminée par l'analyse des niveaux d'activation d'Akt. Cette protéine kinase possède 3 isoformes : Akt1, Akt2 et Akt3. Dans les cellules non stimulées, Akt se localise au niveau du cytosol et possède une conformation qui lui confère une très faible activité. En réponse à certains stimuli et suivant l'activation de la PI3K, la protéine kinase Akt est recrutée à la membrane plasmique par les produits lipidiques de la PI3K via une interaction avec son domaine d'homologie à la pleckstrine. Cette interaction induit la translocation d'Akt à partir du cytosol vers le feuillet interne de la membrane plasmique, entraînant ainsi des changements conformationnels permettant à la kinase d'être pleinement activée. La phosphorylation de deux résidus spécifiques sont nécessaires à la pleine activation de

l'enzyme, soit la Thr³⁰⁸ et la Ser⁴⁷³. Tout d'abord, la Thr³⁰⁸ est située dans le domaine kinase de la protéine et sa phosphorylation est effectuée par la kinase PDK-1. La Ser⁴⁷³ est, quant à elle, située au niveau de la queue C-terminale de la protéine (Scheid et Woodgett, 2001). Toutefois, l'identité de la kinase qui phosphoryle Akt sur la Ser⁴⁷³ demeure encore inconnue jusqu'à ce jour.

4.2.2 Rôle de la PI3K et d'Akt dans régulation de la migration cellulaire

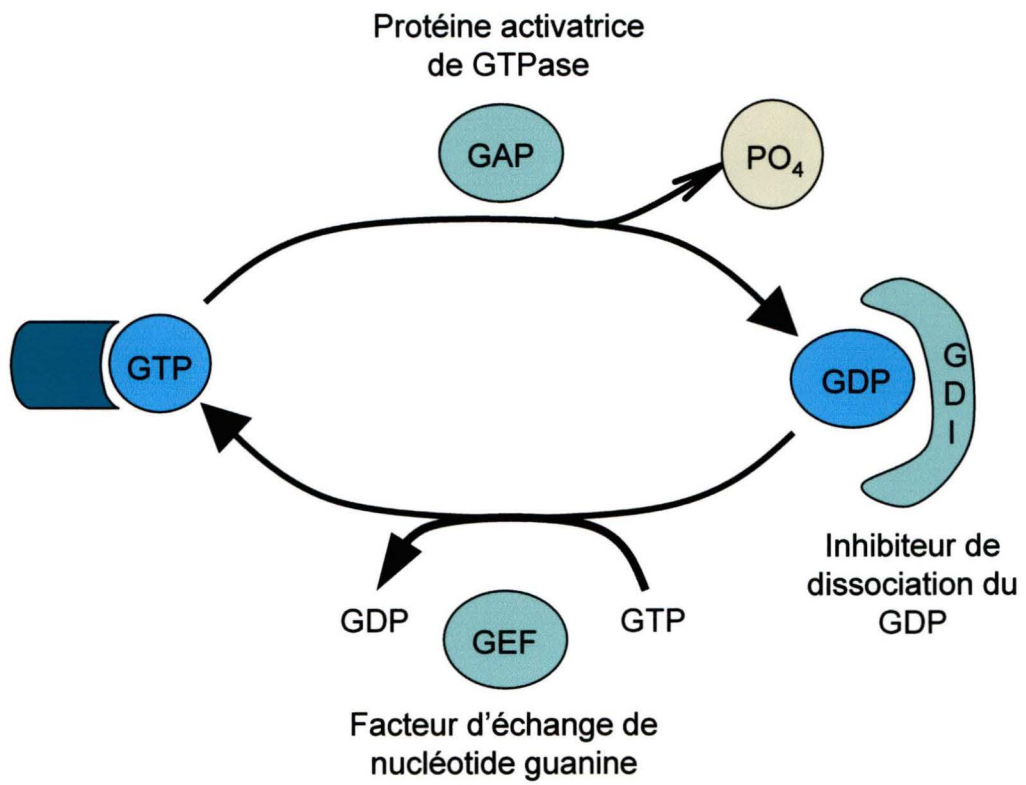
Le rôle de la PI3K dans le contrôle de la migration cellulaire commence à être bien documenté. Dans les cellules *Dictyostelium*, l'activation de la PI3K est un événement important et nécessaire pour le contrôle du processus de chimiotropisme. En effet, il a été démontré que l'application d'un stimulus chimiotropique dans ces cellules induit une activation très rapide de la PI3K (i.e. de l'ordre de quelques minutes seulement) à la marge des cellules en migration, ce qui mène à la production des seconds messagers lipidiques de la PI3K et au recrutement à la membrane de diverses protéines contenant un domaine PH, telles que Akt (Firtel et al., 2001; Qian et al., 2005; Qian et al., 2004). Ces observations suggèrent que l'activation de la PI3K pourrait être une des premières étapes dans l'initiation de la migration des cellules *Dictyostelium*. Récemment, l'activité de la PI3K a été démontrée comme étant suffisante pour induire le remodelage des filaments d'actine et la migration des cellules de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF) (Qian et al., 2004). Dans cette étude, les kinases Akt et p70S6K ont été identifiées comme étant les molécules en aval responsables de médier les effets de la PI3K sur la réorganisation des filaments d'actine et la migration cellulaire. De plus, dans les cellules épithéliales gastriques immortalisées de souris IMGE-5, il a été rapporté que l'effet positif du facteur de croissance HGF sur la migration cellulaire pouvait être

renversé suite à un traitement des monocouches blessées avec l'inhibiteur de la PI3K (LY294002), suggérant ainsi l'implication de la PI3K dans la régulation de la restitution épithéliale gastrique induite par le HGF (Hollande et al., 2001). Finalement, un défaut dans la réparation *in vivo* des muqueuses gastriques de rat souffrant d'hypertension portale a été associé avec une activation réduite de la voie de signalisation PI3K/Akt (Tsugawa et al., 2003).

4.3 Voies de signalisation des RhoGTPases

Les GTPases de la famille Rho (appelées aussi petites protéines G de la famille Rho ou RhoGTPases) fonctionnent comme des intégrateurs de signaux transmis par les stimuli extracellulaires qui déclenchent de multiples processus physiologiques, tels que la motilité cellulaire, l'adhésion, la cytokinèse, la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Révisé dans Etienne-Manneville et Hall, 2002; Ridley, 2001). La famille des RhoGTPases comprend 3 sous-familles : Rho (RhoA, RhoB et RhoC), Rac (Rac-1, Rac-2 et Rac-3) et Cdc-42. Cdc-42, Rac-1 et RhoA sont les membres de la famille des RhoGTPases les plus caractérisés jusqu'à ce jour. Les RhoGTPases cyclent entre un état inactif (lié au GDP) et un état actif (lié au GTP) (Figure 12). Dans des conditions basales, ces protéines se retrouvent sous une forme inactive liée au GDP. Suivant une stimulation, ces protéines relâchent le GDP pour se lier au GTP, une réaction qui est accomplie par des facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEFs, guanine nucleotide exchange factors). Cet état actif des RhoGTPases est transitoire puisque leur activité GTPase intrinsèque est rapidement stimulée par des protéines activatrices de GTPases (GAPs) (Schmidt et Hall, 2002; Moon et Zheng, 2003). De plus, les petites protéines de la famille Rho peuvent se lier à des protéines

Figure 12. Mécanismes d'activation et d'inhibition des RhoGTPases. Régulation des protéines de la famille des RhoGTPases. La plupart des protéines de la famille des RhoGTPases sont actives lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles sont liées au GDP. Leur activation est catalysée par les facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) alors que leur inactivation est médiée par les protéines activatrices de GTPase (GAP). Plusieurs membres de la famille des RhoGTPases se lient également à des inhibiteurs de dissociation du GDP (GDI) dans le cytoplasme, les rendant inactifs dans ce complexe. Ainsi, leur activation dépend aussi de leur dissociation des GDI. Tirée et modifiée de Étienne-Manneville et Hall, 2002.



connues sous le nom d'inhibiteurs de dissociation de nucléotide guanine (GDI, guanine-nucleotide dissociation inhibitors), ce qui prévient leur interaction avec la membrane plasmique, mais pas nécessairement avec les effecteurs en aval (Carpenter et al., 1999; Hansen et Nelson, 2001). De plus, l'activité des RhoGTPases est soumise à une régulation spatio-temporelle très précise qui est cruciale pour assumer ses différentes fonctions cellulaires déterminantes. Finalement, il est possible d'inhiber les RhoGTPases de manière pharmacologique en traitant les cellules avec la toxine B (Just et al., 1994). La toxine B est un facteur de virulence sécrété par *Clostridium difficile* qui modifie les protéines Rho, Rac et Cdc-42 en glycosylant un résidu thréonine spécifique retrouvé au niveau du domaine effecteur (Thr³⁷ pour Rho et Thr³⁵ pour Rac et Cdc-42). Un traitement avec cette toxine résulte en une altération profonde du cytosquelette et mène également à l'arrondissement des cellules traitées (Just et al., 1994; Santos et al., 1997).

4.3.1 Rôle des RhoGTPases dans la régulation de la migration cellulaire

La participation de Rac-1, Cdc-42 et RhoA dans les processus d'étalement et de migration a été rapportée dans de nombreux modèles cellulaires (Ridley, 2001; Hall, 2005). Dans la lignée cellulaire fibroblastique Swiss 3T3, l'activation de Rac-1 induit la formation de lamellipodes (larges extensions cytoplasmiques), alors que l'activation de Cdc-42 stimule plutôt la polymérisation de l'actine en filopodes (longues et minces extensions). De façon contraire, RhoA régule la formation de faisceaux d'actine en fibres de stress, en plus de stimuler la formation de complexes d'adhésion focaux (Ridley et Hall, 1992a; Ridley et al., 1992b; Nobes et Hall, 1995). Le rôle des RhoGTPases a également été confirmé dans la migration des cellules épithéliales

intestinales IEC-6 et Caco-2. Tout d'abord, le traitement des cellules avec les inhibiteurs des RhoGTPases toxine A et toxine B inhibe la migration directionnelle de façon dose-dépendante (Santos et al., 1997). De plus, la microinjection d'un inhibiteur de dissociation guanine spécifique à Rho (RHOGDI) dans les cellules IEC-6 inhibe spontanément la migration épithéliale intestinale (Santos et al., 1997). Finalement, la microinjection de la toxine C3, un inhibiteur de Rho, dans les cellules intestinales bordant la blessure inhibe la migration de manière dose-dépendante, en plus de désorganiser les fibres de stress d'actine (Just et al., 1994; Santos et al., 1997).

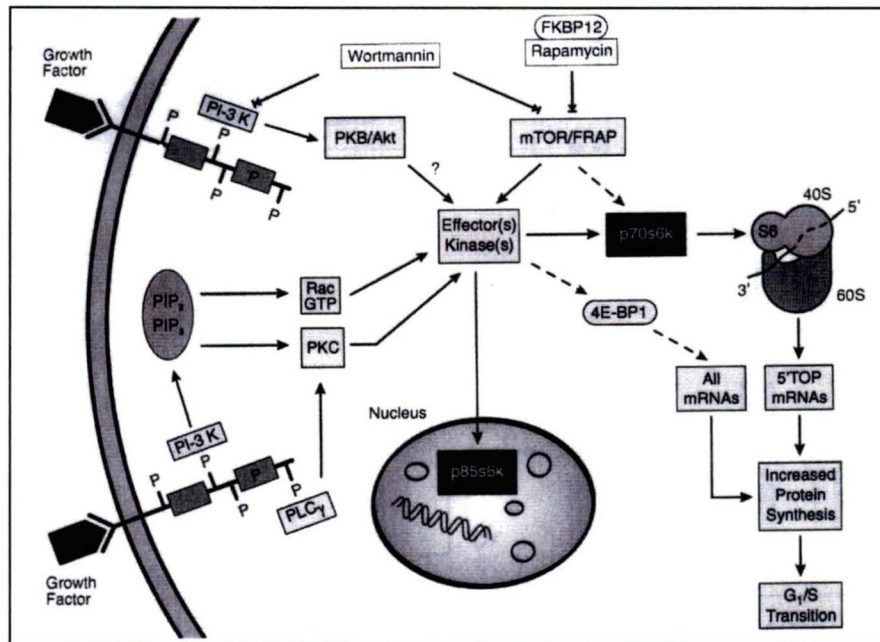
4.4 Voie de signalisation mTOR/p70S6K

La p70S6K (70Kda ribosomal S6 kinase ou S6K1) est une sérine/thréonine kinase activée par de nombreux mitogènes, facteurs de croissance et hormones. Jusqu'à maintenant, 2 isoformes ont été identifiées, soit une forme cytoplasmique de 70kDa et une forme nucléaire de 85kDa. La différence entre ces 2 isoformes se situe au niveau d'une séquence de localisation nucléaire de 23AA retrouvée uniquement dans la forme la plus longue de la kinase. La protéine p70S6K peut être divisée en quatre différents modules fonctionnels (Pullen et Thomas, 1997). Tout d'abord, le module I s'étend de l'extrémité N-terminale jusqu'au commencement du domaine catalytique (Weng et al., 1995; Cheatham et al., 1995; Dennis et al., 1996). Le module II comprend quant à lui le domaine catalytique, ce qui inclut le site vital de phosphorylation Thr²²⁹ (Pearson et al., 1995; Weng et al., 1995). Le module III fait le lien entre le domaine catalytique de la kinase et la queue C-terminale et il contient deux autres sites vitaux de phosphorylation (Thr³⁸⁹ et Ser⁴⁰⁴). Finalement, le module IV comprend le domaine putatif d'auto-inhibition qui renferme quatre sites de phosphorylation étroitement agglomérés (Ser⁴¹¹,

Ser⁴¹⁸, Thr⁴²¹ et Ser⁴²⁴). L'activation de la p70S6K survient via une série complexe d'événements de phosphorylation interdépendants sur au moins 8 résidus sérine ou thréonine (Ser⁴⁰⁴, Ser⁴¹¹, Ser⁴¹⁸, Ser⁴²⁴, Thr⁴²¹, Thr⁴²⁹, Ser³⁷¹ et Thr³⁸⁹). Dans un premier temps, la phosphorylation des résidus localisés dans la boucle d'auto-inhibition induit un changement conformationnel, permettant par la suite la phosphorylation des résidus situés dans les sites catalytiques. Il est important de noter que la pleine activation de l'enzyme nécessite la phosphorylation de la Thr²²⁹ par la sérine/thréonine kinase PDK1 et la phosphorylation de la Thr³⁸⁹ par mTOR (Isotani et al., 1999; Berven et Crouch, 2000). Aussi, dans les cellules stimulées, la p70S6K a été démontrée comme étant un effecteur en aval de la PI3K (Figure 13) (Pullen et Thomas, 1997; Ferrari et Thomas, 1994). L'inactivation de la p70S6K par la déphosphorylation à des sites spécifiques est possible grâce à un traitement à la rapamycine (Dumont et Su, 1996), un macrolide bactérien formant un complexe inhibiteur lorsqu'il est lié à l'immunophiline FKBP12, ciblant ainsi la protéine de large poids moléculaire mTOR (ou FRAP), ce qui inhibe subséquemment l'activation de la p70S6K (Figure 13).

La principale cible physiologique de la p70S6K est la sous-unité 40S de la protéine ribosomale S6 (Figure 13). La phosphorylation de la protéine S6 induit la traduction des ARNm possédant un motif TOP à leur extrémité 5', un sous-groupe d'ARNm qui code pour des composants de la machinerie traductionnelle tels que les facteurs d'élongation, les protéines ribosomales et la protéine de liaison poly(A). La p70S6K joue ainsi un rôle clé dans l'efficacité traductionnelle. En plus de ce rôle dans la synthèse protéique, l'activation de la p70S6K a été impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation et de la migration cellulaire (Figure 13) (Berven et Crouch, 2000).

Figure 13. La voie de signalisation de la p70S6K. Représentation schématique des principaux activateurs, effecteurs et inhibiteurs de l'activité de la p70S6K. Tirée de Pullen et Thomas, 1997.



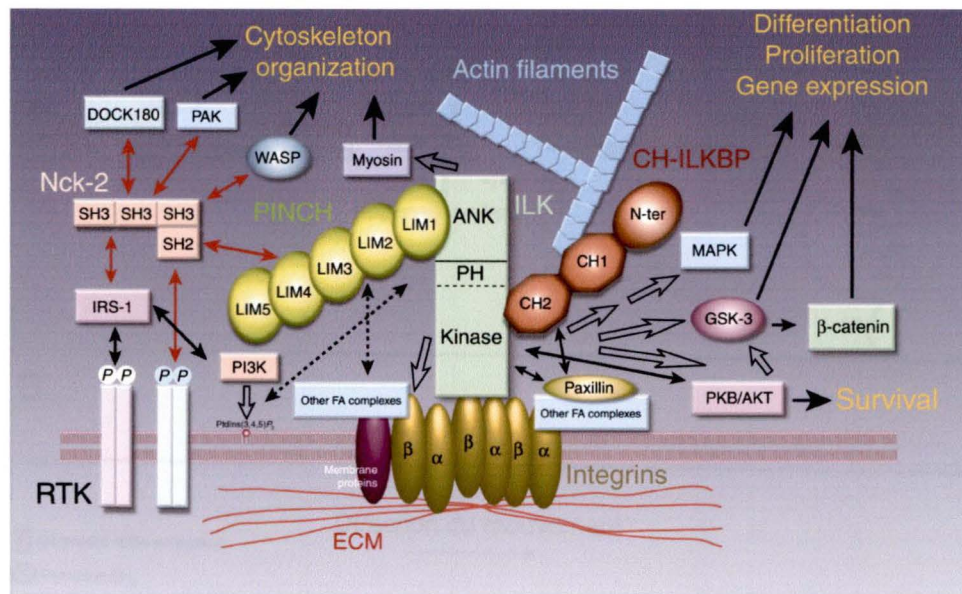
4.4.1 Rôle de la p70S6K dans la régulation de la migration cellulaire

De plus en plus d'évidences dans la littérature suggèrent que la p70S6K joue un rôle dans le contrôle de la migration cellulaire et dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Tout d'abord, il a été démontré que la p70S6K s'associe avec les RhoGTPases Rac-1 et Cdc-42 (Chou et al., 1996). De plus, dans les cellules fibroblastiques 3T3, il a été rapporté que la p70S6K co-localise avec les fibres de stress, suggérant un rôle pour cette kinase dans la polymérisation de l'actine (Berven et al., 2004; Crouch, 1997). Finalement, l'implication de la p70S6K dans le processus de réparation de blessure induit par les facteurs de croissance HGF et KGF a récemment été rapportée dans des cultures primaires de cellules épithéliales de cornées (Chandrasekher et al., 2001). En effet, un retard dans la réparation des blessures a été observé dans les cellules stimulées aux facteurs de croissance HGF et KGF et traitées en combinaison avec la rapamycine, l'inhibiteur de la voie mTOR/p70S6K.

4.5 Voie de signalisation ILK

L'ILK (integrin-linked kinase) est une protéine à multi-domaines impliquée initialement dans la transduction de signal à partir des récepteurs intégrines et qui joue un rôle dans le contrôle d'une variété de processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire, l'adhésion, la survie, l'étalement, la migration, les réorganisations du cytosquelette et les modifications de la matrice extracellulaire (Legate et al., 2006; Wu et Dedhar, 2001; Zhang et al., 2002; Qian et al., 2005). Des études récentes ont démontré que ILK est la composante centrale du complexe hétéro-trimérique IPP, un complexe composé également des protéines adaptatrices PINCH et des parvines (Figure 14). De plus, il a été démontré que ILK est un partenaire de liaison des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ des

Figure 14. La voie de signalisation ILK. ILK est une protéine à multi-domaines qui se lie à une variété de protéines, menant subséquemment à l'induction de différentes voies de signalisation en aval. En plus d'interagir avec les domaines cytoplasmiques des sous-unités β des intégrines, ILK se lie également aux protéines adaptatrice PINCH et aux parvines (également nommée CH-ILKBP). ILK ne sert pas uniquement de protéine d'échafaudage aux sites d'adhésion cellule-matrice extracellulaire, celle-ci participe aussi aux voies de transduction de signal contrôlant une variété de processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire, l'adhésion, la survie, l'étalement, la migration, les réorganisations du cytosquelette et les modifications de la matrice extracellulaire. Tirée de Wu, 2004.



intégrines (Hannigan et al., 1996 ; Wu et Dedhar, 2001). Au niveau de sa structure, ILK contient 3 différents domaines : un domaine N-terminal, un domaine d'homologie pleckstrine (PH) et un domaine C-terminal. Tout d'abord, le domaine N-terminal contient 3 répétitions ankyrine permettant de médier les interactions protéine-protéine. Ce domaine possède également une quatrième répétition ankyrine putative dans laquelle il manque certains résidus conservés. La portion C-terminale de la protéine possède quant à elle une homologie significative de séquence à d'autres domaines catalytiques sérine/thréonine kinase. Finalement, un domaine putatif PH est retrouvé entre les portions N-terminale et C-terminale de la protéine. Initialement, ILK a été démontrée pour jouer un rôle comme protéine adaptatrice (Legate et al., 2006). Il a été rapporté par la suite que cette protéine possède également une activité catalytique. En effet, tel qu'il a été mentionné précédemment, le domaine kinase d'ILK possède une homologie significative aux sérine/thréonine kinases, à l'exception de certaines séquences retrouvées au niveau de la boucle catalytique et d'un motif DXG (Hanks et al., 1988; Hanks et Hunter, 1995). *In vitro*, ILK est connue pour phosphoryler plusieurs substrats, tels que myelin basic protein (MBP), Akt, GSK3 β , β -parvine et les intégrines α 1 et α 3 (révisé dans Legate et al., 2006).

4.5.1 Rôle de ILK dans la régulation de la migration cellulaire

L'implication d'ILK dans la modulation des réarrangements du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire commence, depuis quelques années, à être documentée. Dans les cellules épithéliales mammaires SCP2, l'activité kinase d'ILK joue un rôle essentiel dans la réorganisation du cytosquelette d'actine médiée par Rac-1 et Cdc-42 (Filipenko

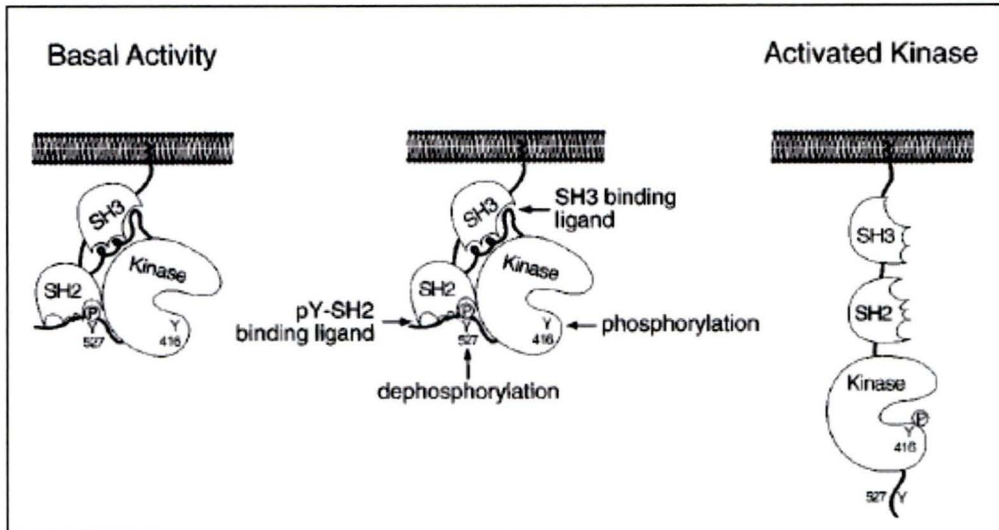
et al., 2005). De plus, l'interaction entre PINCH-1 et ILK est critique pour contrôler la morphologie et la migration des cellules de fibroblastes embryonnaires de rat REF-52 (Zhang et al., 2002). Finalement, ILK est responsable du contrôle de la migration, de l'invasion et de la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF) via la voie de signalisation PI3K/Akt/p70S6K/Rac-1 (Qian et al., 2005).

4.6 Voie de signalisation Src

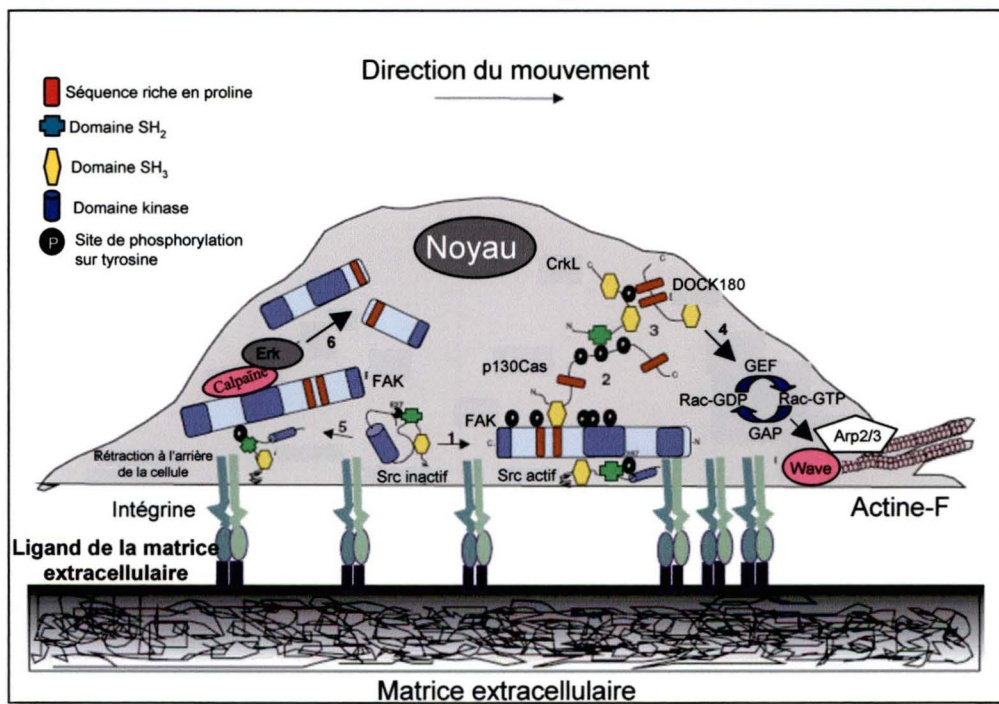
Pp60c-src et les protéines de la famille Src sont des tyrosine kinases connues pour jouer des rôles clés au niveau de divers processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la différenciation, la morphologie, la migration et la survie (Chang et al., 1995; Weernink et Rijksen, 1995; Karni et al., 1999; Brown et Cooper, 1996; Thomas et Brugge, 1997). Les 9 membres de la famille Src incluent : pp60c-src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes et Yrk. Les tyrosine kinases de la famille Src possèdent une structure conservée de plusieurs domaines consécutifs, comprenant un domaine SH3, SH2 et SH1 (domaine catalytique à activité tyrosine kinase). Ceux-ci possèdent également un domaine SH4 qui est situé dans la portion N-terminale de la protéine. Ce domaine, qui est continuellement retrouvé sous-forme myristylé, permet le ciblage de la protéine à la membrane (Koegl et al., 1994; Resh, 1999). Finalement, les membres de la famille Src possèdent une courte queue contenant un site de phosphorylation auto-inhibiteur dans la portion C-terminale de la protéine (Brown et Cooper, 1996). Afin d'acquérir leur pleine activité catalytique, les membres de la famille Src requièrent une phosphorylation au niveau de leur domaine kinasique. Dans le cas de la protéine pp60c-src, ce site de phosphorylation est situé au niveau de la Tyr⁴¹⁶ (Smart et al., 1981) (Fig. 15). Dans leur

Figure 15. La voie de signalisation Src. A, Mécanismes impliqués dans l'activation des kinases de la famille Src. Le panneau en haut à gauche montre un modèle de la structure de Src sous forme inactive et phosphorylée au niveau de la tyrosine 527. Le panneau en haut au milieu montre les mécanismes potentiels impliqués dans l'activation de Src. La tyrosine 416 représente le site d'auto-phosphorylation situé dans la boucle d'activation de Src. Le panneau en haut à droite représente un modèle de l'état actif de Src dans lequel les interactions intramoléculaires des domaines SH2 et SH3 sont détruites. Tirée de Thomas et Brugge, 1997. **B, Les kinases de la famille Src régulent l'étalement cellulaire et le désassemblage des adhésions focales par différents mécanismes survenant à l'avant et à l'arrière de la cellule en migration.** Un complexe contenant Src auto-phosphorylé sur la Tyr 416 et FAK mène à la phosphorylation de FAK dépendante de Src (1) et de p130Cas (2). La liaison de p130Cas active Rac et Cdc-42 par la translocation de l'activateur de Rac, DOCK1 (3). Rac et Cdc-42 sous formes actives promouvoient la formation de protrusions à l'extrémité de la cellule en migration via l'activation du complexe Arp2/3 dépendante de WASP/WAVE (4). À l'arrière de la cellule, le désassemblage des adhésions focales et le détachement cellule-substrat mène à la rétraction de l'arrière de la cellule. Suivant la transformation cellulaire médiée par v-src (ou possiblement par Src durant le processus normal de migration cellulaire) (5), un complexe entre FAK, ERK et la calpaïne-2 s'assemble, menant au clivage de FAK de manière calpaïne-dépendante (6). Adaptée de Playford et Schaeffer, 2004.

A.



B.



état inactif, les protéines Src sont phosphorylées au niveau de la Tyr⁵²⁷ (Fig. 15). Les membres de la famille Src sont contrôlés par les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, les intégrines, les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs aux cytokines et les récepteurs d'hormones stéroïdiennes (Thomas et Brugge, 1997). Finalement, l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src est possible grâce à un traitement avec l'inhibiteur pharmacologique PP2 (Hanke et al., 1996).

4.6.1 Rôle de Src dans la régulation de la migration cellulaire

Certaines évidences de la littérature ont suggéré l'implication des tyrosines kinases de la famille Src dans la migration et l'étalement cellulaire stimulés par les récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine kinase et par les intégrines (Fig. 15). Par exemple, l'inhibiteur pharmacologique PP2 inhibe le chimiotropisme et la migration cellulaire induite par le VEGF dans les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs) (Abu-Ghazaleh et al., 2001). Aussi, dans les cellules épithéliales intestinales Ls174t, la transactivation du récepteur de l'EGF médiée par c-src et les prostaglandines E2 (PgE2) a été rapportée pour réguler la migration et l'invasion cellulaire (Buchanan et al., 2003).

5. Régénération épithéliale gastrique

5.1 Problématique

Tel qu'il a été mentionné précédemment, nos connaissances actuelles des facteurs de croissance impliqués dans la modulation de la régénération épithéliale du tube digestif proviennent essentiellement des expériences réalisées au niveau des cellules

épithéliales intestinales. De façon paradoxale, nos connaissances quant à l'identité des facteurs et des mécanismes potentiels qui contrôlent la régénération épithéliale gastrique en général sont très fragmentaires et chez l'humain, elles sont inexistantes. Les limitations importantes découlent de l'absence de lignées épithéliales gastriques humaines normales et du faible degré de différenciation des lignées cancéreuses disponibles.

5.2 Modèles cellulaires

5.2.1 Les cellules HGE (HGE-17 et HGE-20)

L'absence de modèles cellulaires représentatifs de l'épithélium glandulaire gastrique capables de former une véritable monocouche barrière fonctionnelle restreignait, jusqu'à tout récemment, l'application de la culture cellulaire pour l'étude expérimentale *in vitro* de la régénération épithéliale gastrique. Dans le but d'établir de nouveaux modèles cellulaires adéquats à l'étude de la régulation des fonctions digestives gastriques, le laboratoire du Dr Daniel Ménard a entrepris la caractérisation de quatre lignées épithéliales gastriques humaines d'origine cancéreuse (Basque et al., 2001). Ces travaux ont permis la démonstration d'un statut fonctionnel unique et distinct des cellules de carcinome gastrique humain NCI-N87, comparativement aux cellules KATO-III, AGS et Hs746t. En plus de former une monocouche cohérente exprimant et distribuant adéquatement la protéine jonctionnelle Cad-E dans toutes les cellules, la lignée NCI-N87 exprime la protéine jonctionnelle ZO-1 dans une sous-population de cellules, croissent sous forme de colonies denses, se maintiennent en culture à post-confluence et expriment des niveaux de zymogènes gastriques (Pg-5 et HGL) et de mucine-6 (MUC-6). Le clonage de la lignée NCI-N87 par l'approche de la dilution limite a permis

la sélection d'une vingtaine de clones dont deux lignées présentant des caractéristiques uniques nommées HGE-17 et HGE-20.

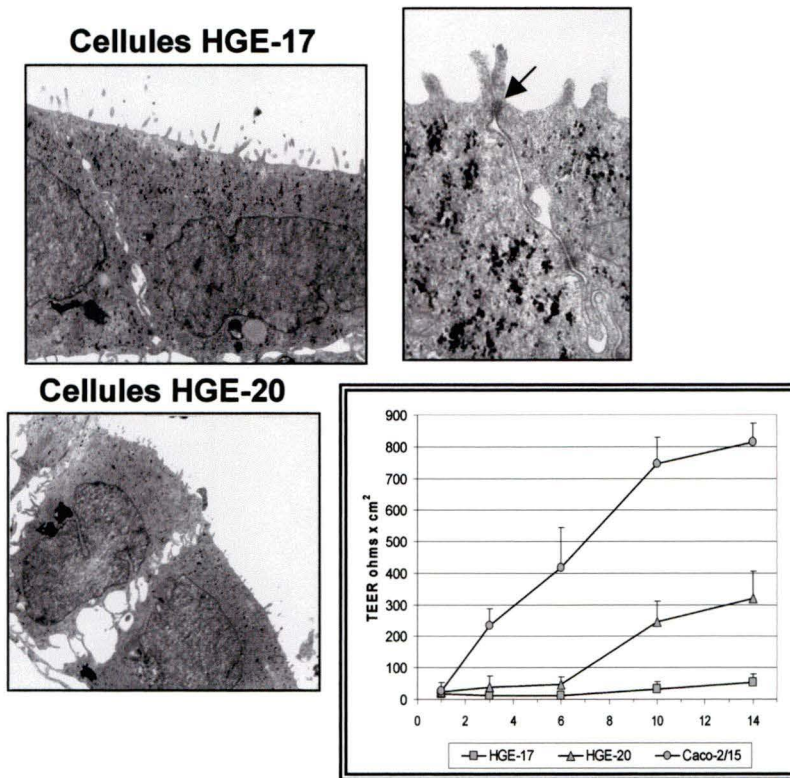
Les cellules HGE-17 et HGE-20 constituent les premières lignées épithéliales gastriques à présenter des caractéristiques épithéliales vraies (polarité ultrastructurale, présence de jonctions serrées), en plus d'exprimer uniformément les protéines jonctionnelles Cad-E et ZO-1 (Figure 16) (Chailler et Ménard, 2005). De plus, ces cellules répondent aux facteurs de croissance mitogènes connus pour l'épithélium gastrique (Chailler et Ménard, 2005), forment une véritable monocouche barrière à l'atteinte de la confluence (Fig. 16C) et répondent fortement aux facteurs de croissance $TGF\alpha$ /EGF dans un essai de régénération (Chailler et Ménard, 2005). L'analyse du statut fonctionnel des cellules HGE a démontré que les cellules HGE-17 sécrètent peu de zymogènes gastriques et de mucus et exhibent un phénotype peu différencié rappelant celui des progéniteurs épithéliaux de glandes gastriques. Les cellules HGE-20 produisent quant à elles des niveaux augmentés de zymogènes gastriques et expriment également MUC-6. Le statut fonctionnel de ces cellules est donc similaire à celui des cellules pré-zymogéniques (Karam et Leblond, 1993).

5.2.2 Culture primaire d'épithélium gastrique humain

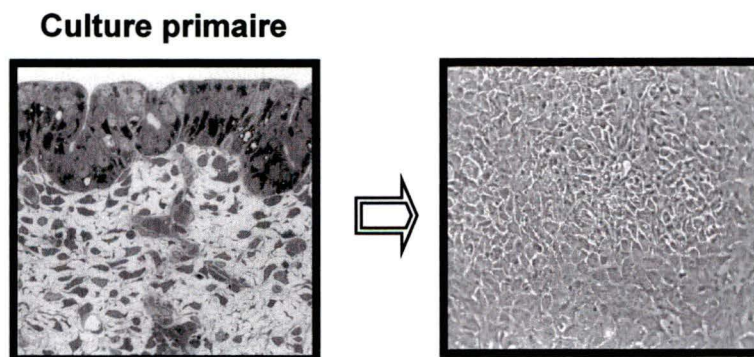
Afin d'étudier les propriétés des cellules épithéliales gastriques normales, il est maintenant possible d'utiliser le système des cultures primaires (Figure 16). En effet, l'addition d'une solution non-enzymatique Matrisperse à des explants foetaux humains a permis de générer des cultures primaires gastriques représentatives de l'épithélium

Figure 16. Modèles cellulaires utilisés pour l'étude de la régénération épithéliale gastrique humaine. **A, Lignées cellulaires HGE-17 et HGE-20.** Les analyses de microscopie électronique à transmission montrent que les cellules HGE-17 exhibent un phénotype peu différencié. Suivant l'atteinte de la confluence (6 jours post-confluence), les jonctions apicales sont assemblées progressivement (flèche noire, figure de droite). Grossissement : 11,000x (Haut à gauche); 48,000x (Haut droite). Les cellules HGE-20 forment quant à elles des jonctions intercellulaires et acquièrent un phénotype plus différencié après 6-10 jours de post-confluence. Grossissement : 7,060x (Bas). De plus, suivant l'atteinte de la confluence, les cellules HGE-17 et HGE-20 forment une véritable monocouche barrière générant de la résistance transépithéliale (graphique du bas). Tirée de Chailler et Ménard, 2005. **B, Culture primaire de cellules épithéliales normales gastriques humaines.** Les cultures primaires représentatives de l'épithélium intact sont générées à partir de tissu fœtal à l'aide d'une solution non enzymatique Matrisperse. Les cellules forment à confluence une monocouche barrière et demeurent fonctionnelles au moins 7 jours. Grossissement : 10x.

A.



B.



intact (60% cellules à mucus, 25% cellules principales, 5% cellules pariétales, sous-population de cellules mitotiques) (Basque et al., 1999). Les cellules forment à confluence une monocouche barrière et demeurent fonctionnelles durant au moins 7 jours. De plus, contrairement aux autres systèmes de culture primaire existants, ces populations de cellules conservent leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles en absence de matrice biologique. Compte tenu de la difficulté de l'établissement et du maintien en culture de lignées normales dérivées de la muqueuse gastrique humaine, le système de culture primaire peut être utilisé pour valider au niveau d'un épithélium gastrique normal les principaux concepts de régénération établis dans les cellules HGE.

5.3 Objectifs

Étant donné que le maintien de l'intégrité épithéliale est primordial pour l'homéostasie de la muqueuse gastrique normale et pathologique et que nos connaissances sur les mécanismes régulateurs impliqués dans cet homéostasie sont très limitées, les objectifs suivants ont été établis :

- 1) Identifier les facteurs de croissance impliqués et caractériser leurs effets sur la régénération épithéliale gastrique humaine.
- 2) Identifier et caractériser les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la modulation de la restitution épithéliale gastrique.

- 3) Discriminer les facteurs de croissance et les voies de signalisation qui sont spécifiquement impliqués dans le processus d'étalement versus la migration cellulaire.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires HGE-17 et HGE-20 ont été clonées dans notre laboratoire à partir de la souche parentale NCI-N87 (ATCC, CRL-5822, Manassas, VA, USA; carcinome gastrique humain de type différencié) et ont été caractérisées antérieurement (Chailler et Menard, 2005). Les cultures primaires épithéliales ont été générées à partir de la muqueuse gastrique foetale humaine à l'aide d'une procédure non-enzymatique (Basque et al., 1999) (Matrisperse Cell Recovery Solution obtenue chez BD Biosciences, Clontech, Palo Alto, CA). Ces cultures contenant tous les types cellulaires prolifératifs et différenciés sont représentatives de l'épithélium gastrique intact et peuvent être maintenues sur plastique pour plusieurs jours. Les lignées HGE et les cultures primaires ont été incubées respectivement dans du milieu DMEM (Invitrogen/Gibco, Burlington, ON, Canada) ou dans un mélange de DMEM/F12 (Invitrogen/Gibco, Burlington, ON, Canada) supplémentés avec de la pénicilline/streptomycine (50U/ml, Invitrogen/Gibco, Burlington, ON, Canada) et 10% (v : v) de sérum foetal bovin (FBS, Collect-Gold FBS, ICN Pharmaceuticals, Montréal, QC, Canada) inactivé par la chaleur. Suivant leur décongélation, les cellules HGE ont été assujetties à 3 à 5 passages à l'aide d'une solution de 0,25% de trypsine et de 0,53 mM d'EDTA (Invitrogen/Gibco, Burlington, ON, Canada) avant de procéder aux différentes expériences.

2. Essais de blessure

2.1 Blessure avec une lame de rasoir

Les cultures HGE et les cultures primaires épithéliales ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits et cultivées jusqu'à l'atteinte de la confluence. En utilisant une méthode standardisée pour les cultures de cellules épithéliales intestinales de rat (IEC-6) (Ciacci et al. 1993), les monocouches ont été blessées avec une lame de rasoir affûtée (2 blessures par puit, chacune mesurant 13 mm de large par environ 7 mm de long). Les cultures blessées ont été rincées puis incubées durant 24 ou 40 heures dans du milieu DMEM : F12 (1 :1, v : v) dans des conditions réduites en sérum spécifiques à chaque type de culture : FBS 0,1% pour les cellules HGE-17, FBS 1% pour les cellules HGE-20 post-confluentes et FBS 4% pour les cultures primaires. Les effets spécifiques de la prolifération cellulaire indépendants de la restitution épithéliale ont été évalués par l'addition simultanée de 20 mM d'hydroxyurée (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), un bloqueur du cycle cellulaire et ce, dans des conditions réduites en sérum spécifiques à chaque type de culture.

Les premières séries d'expériences ont été effectuées dans le but de tester les effets de différents facteurs de croissance connus pour être des inducteurs de la migration dans les cultures primaires de cellules épithéliales gastriques de lapin et de chien (Kato et al. 1999, Watanabe et al. 1994, Watanabe et al. 2000). Les stimulations maximales et demi-maximales de la prolifération des cellules HGE-17 ont été obtenues aux concentrations suivantes : 5-50 ng/ml EGF/TGF α (BD

Biosciences, Bedford, MA), 3-20 ng/ml HGF (Calbiochem, La Jolla, CA), 10-100 ng/ml IGF-I, -II (BD Biosciences, Bedford, MA) et leurs analogues tronqués R³IGF-I, Del (1-6) IGF-II (Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY). À noter que ces derniers peptides sont connus pour être incapables de se lier aux protéines de liaison à l'IGF (IGFBP) et ont été démontrés antérieurement pour induire des effets optimaux sur la prolifération épithéliale gastrique humaine en comparaison aux formes natives IGFBP-dépendantes (Tremblay et al. 2001).

Puisqu'il est connu pour ses effets inhibiteurs sur la prolifération cellulaire et pour ses effets inducteurs sur la motilité dans d'autres modèles cellulaires, le TGFβ1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) a été testé à des concentrations variant de 0,5 à 5 ng/ml, celles-ci étant connues pour supporter le maintien de la morphologie et des fonctions sécrétrices dans les cultures primaires gastriques humaines (Basque et al. 2002). La neutralisation de la bioactivité du TGFβ1 et son effet potentiel sur la régénération basale et stimulée aux facteurs de croissance a été accomplie par l'addition simultanée d'un anticorps neutralisant TGFβ pan-spécifique (10 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN). L'effet neutralisant de l'anticorps anti-TGFβ pan-spécifique a été, à priori, validé sur des cultures de cellules IEC-6, celles-ci servant de contrôle positif de neutralisation (Ciacci et al. 1993). En effet, la présence de cet anticorps a bloqué l'effet stimulateur du TGFβ1 sur la restitution des cellules IEC-6 (résultats non montrés).

Les cibles intracellulaires putatives impliquées dans la restitution ont été déterminées par l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques suivants : LY294002 (PI3K) (5 μ M, Calbiochem, La Jolla, CA), PD98059 (20 μ M, Calbiochem, La Jolla, CA), rapamycine (mTOR) (25 nM, Biomol Research Laboratories Inc, Plymouth Meeting, PA, USA), PP2 (Src) (5 μ M, Calbiochem, La Jolla, CA) et PD153035 (EGFR) (10 μ M, Calbiochem, La Jolla, CA). À noter que ces inhibiteurs ont été ajoutés 30 minutes avant d'effectuer les blessures.

2.2 Quantification de la régénération/restitution

À la fin de chaque expérience, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS, puis contrastées avec un colorant GIEMSA. Les processus de régénération et de restitution ont été quantifiés par microscopie à contraste de phase en comptant le nombre de cellules ayant traversé la marge de la blessure de 13 mm (marque laissée par la lame de rasoir). La régénération a également été quantifiée en mesurant la surface recouverte (en mm^2) par les cellules régénératrices dans différentes conditions de culture à l'aide du logiciel d'analyse et d'imagerie cellulaire Metamorph 4.6 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). La distance (en μm) parcourue par les cellules de type <<leader>> à partir de la marge de la blessure a aussi été appréciée par microscopie vidéo en temps réel (grossissement de 220x) à l'aide du logiciel Zeiss Axiovision.

2.3 Essais de micro-blessure

Les essais de micro-blessure ont été effectués selon une méthode standardisée pour les cellules intestinales T84, tel qu'il a été décrit antérieurement (Mercurio AM et al. 2000). Des cellules HGE-17 ont étéensemencées dans des plaques à 24 puits, puis cultivées jusqu'à l'atteinte de la confluence. De minuscules blessures circulaires (75-100 μm) ont été effectuées par aspiration à l'aide d'une aiguille préalablement fixée à l'extrémité d'une seringue. Les cultures blessées ont été rincées, puis incubées dans du milieu DMEM/F12 (1 :1, v : v) contenant une concentration réduite en sérum (FBS 0,1%), avec ou sans différents régulateurs exogènes. De plus, l'addition simultanée du bloqueur du cycle cellulaire hydroxyurée (20 mM) a permis d'analyser les effets des différents régulateurs spécifiquement sur l'étalement cellulaire. Les effets des facteurs de croissance sur l'étalement cellulaire ont été évalués par l'utilisation de différents facteurs de croissance exogènes aux concentrations suivantes : TGF α (5 ng/ml), EGF (5 ng/ml), HGF (20 ng/ml) et IGF-I (100 ng/ml). De plus, les cibles intracellulaires putatives impliquées dans la modulation de l'étalement cellulaire ont été déterminées par l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques suivants : LY294002 (PI3K, 5 μM), rapamycine (mTOR, 25 nM), PP2 (Src, 5 μM), PD153035 (EGFR, 10 μM), nocodazole (actine, 3 μM) et cytochalasine D (microtubules, 1 μM). Pour évaluer la progression de la fermeture des blessures, des images ont été prises à différents intervalles de temps à l'aide d'un microscope inversé Leica DM ERBE contenant des optiques à contraste de phase. Les diamètres des blessures ont été mesurés en utilisant le logiciel Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downington, PA). Les diamètres

initiaux et finaux des micro-blessures ont été utilisés pour déterminer les effets des facteurs de croissance et des inhibiteurs pharmacologiques sur la fermeture des blessures.

3. Microscopie électronique à balayage et à contraste de phase

La morphologie cellulaire a été visualisée de façon routinière à l'aide d'un microscope à contraste de phase DMIL. L'ultrastructure épithéliale a été étudiée par microscopie électronique à balayage (scanning electron microscopy, SEM) à l'aide d'un microscope Cambridge Stereoscan S-120. Pour ce faire, les cellules ensemencées sur des lamelles de verre ont été fixées avec de la glutaraldéhyde 2,8% diluée dans un tampon cacodylate 0,2M contenant 7,5 % de sucrose, post-fixées avec 2% de tétroxyde d'osmium et déshydratées progressivement à l'aide d'une série d'incubations à l'éthanol (40-100%). Suivant le retrait de l'éthanol à l'aide d'un séchage critique au dioxyde de carbone liquide, les spécimens ont été recouverts d'or puis soumis à l'analyse morphologique par microscopie électronique à balayage.

4. Microscopie à fluorescence

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre (pour les blessures avec une lame de rasoir) ou dans des plaques à 24 puits (micro-blessures) et cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence. Avant de procéder à la période d'incubation et à l'immunofluorescence, une blessure a été effectuée au centre du spécimen (13 mm de diamètre pour les blessures avec une lame de

rasoir et 75-100 μm pour les micro-blessures). Les cultures ont été fixées avec de la formaldéhyde 3,7% pour 12 minutes et perméabilisées avec du Triton X-100 0,1% dilué dans du tampon PBS (phosphate buffer saline, pH 7,4) pour 3 minutes. Les sites de liaison non-spécifiques de l'anticorps ont été bloqués à l'aide de 2% d'albumine de sérum bovin (fraction V BSA obtenu chez Sigma-Aldrich) dilué dans du tampon PBS. Les cellules ont par la suite été incubées avec les anticorps primaires, puis avec les anticorps conjugués au FITC (anti-souris IgG 1 :30, anti-lapin IgG 1 :50, Chemicon International, Temacula, CA) dilués dans du BSA-PBS 0,2 % à l'intérieur d'une chambre humidifiée pour 60 minutes et 45 minutes respectivement. L'actine filamenteuse (actine-F) a été directement marquée en utilisant une incubation de 60 minutes avec la phalloïdine-FITC (1 :800, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Des lavages extensifs avec du tampon PBS ont été effectués entre chaque étape. Les lamelles ont par la suite été montées sur des lames de verre avec du glycérol : PBS (9 :1). Le marquage fluorescent a été observé à l'aide d'un microscope Reichert Polyvar (Leica) équipé pour l'épifluorescence. À noter que des contrôles négatifs ont été inclus dans toutes les expériences dans lesquelles l'anticorps primaire a été omis ou remplacé par du sérum non-immun. Les anticorps dirigés contre les protéines suivantes ont été utilisés pour les expériences d'immunofluorescence : Ki-67 (1 :600, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), cadhérine-E (1 :800, Transduction Laboratories, San Francisco, CA), occludine (1 :200, Zymed Laboratories, San Francisco, CA), ZO-1 (1 :1500, Zymed Laboratories, San Francisco, CA), tubuline- α (1 :100, Sigma-Aldrich,

Oakville, ON, Canada), sous-unité $\alpha 3$ des intégrines (1 :100, Chemicon, Mississauga, ON, Canada).

5. Index de motilité et de prolifération

L'index de motilité et de prolifération a été calculé sur des spécimens marqués à l'actine-F et au Ki-67, respectivement. En effet, les marquages à l'actine-F ont facilité la visualisation de la forme des cellules ainsi que la visualisation des cellules exhibant au moins un lamellipode en extension au front de régénération (13 mm de large); ces cellules étaient donc considérées comme des cellules motiles. Pour ce qui est des cellules exhibant un noyau positif pour l'antigène nucléaire Ki-67, celles-ci ont été considérées comme des cellules prolifératives. Les résultats sont exprimés en tant que nombre de cellules positives par blessure. À noter que les expériences ont été reproduites 3 à 4 fois pour chaque condition.

6. Immunobuvardage de type Western

Afin de maximiser le nombre de cellules en migration et donc maximiser les niveaux des voies de signalisation intracellulaire activées dans les lysats cellulaires, les monocouches confluentes ont été blessées linéairement à plusieurs reprises. Les cultures blessées ont été lysées à différents intervalles de temps dans un tampon à base de SDS (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2.3%, glycérol 10%, β -mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol 0,005%). Les protéines (50 μ g) obtenues à partir des lysats cellulaires ont été séparés par

SDS-PAGE sur un gel 10% et électro-transférées sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). Les protéines et les marqueurs de poids moléculaires (Invitrogen/Gibco) ont été révélés par un marquage au rouge de Ponceau. Les membranes ont par la suite été bloquées dans du PBS contenant 5 % de lait en poudre et 0,05 % de Tween-20 pour une période d'au moins 5 heures à 25°C, puis incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dans la solution de blocage suivi d'une incubation avec l'anticorps secondaire IgG conjugué à la peroxidase (anti-lapin et anti-souris 1 :10 000, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc, Canada) pour 1 heure. La chemiluminescence a été visualisée en utilisant le système ECL de Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). Les concentrations protéiques ont été mesurées à l'aide d'une méthode de Lowry modifiée utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard (Peterson et al. 1977). Les anticorps dirigés contre les protéines suivantes ont été utilisés pour les expériences d'immunobuvardage : cadhérine-E (1 :5000, Transduction Laboratories, Lexington, KY), récepteur au TGF β de type II (1 :1000, Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY), occludine (1 :800, Zymed Laboratories, San Francisco, CA), ZO-1 (1 :5000, Zymed Laboratories, San Francisco, CA), Akt total (1 :1000, Cell Signaling, Mississauga, ON, Canada), phospho-Akt Ser⁴⁷³ (1 :500, Cell Signaling, Mississauga, ON, Canada), EGFR total (1 :1000, Cell Signaling, Mississauga, ON, Canada), phospho-EGFR Tyr¹⁰⁶⁸ (1 :250, Cell Signaling, Mississauga, ON, Canada), pp60c-Src (1 :1000, Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY), p70S6K total (1 :1000, Upstate

Biotechnology Inc, Lake Placid, NY), ILK (1 :1000, Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY), phospho-p70S6K Thr³⁸⁹; Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴ (1:1000, Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY), Erk1 total (1 :1000, Santa Cruz, CA), phospho-Erk1/2 (1 :1000, Cell Signaling, Mississauga, ON, Canada), étiquette HA (1 :1000, Santa Cruz, CA), étiquette Flag (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

7. Viabilité cellulaire et essai TUNEL

7.1 Essai TUNEL

La détection de bris au niveau des brins d'ADN associés à l'apoptose dans les cellules HGE-17 préalablement cultivées sur des lamelles de verre a été effectuée tel que décrit précédemment (Vachon et al. 1996). Brièvement, les cellules ont été fixées 15 minutes à 4°C avec de la formaldéhyde 3 % diluée dans du tampon phosphate et perméabilisées pour 3 minutes avec du Triton X-100 dilué dans du PBS. Le marquage des extrémités d'UTP ayant subi des coupures médiées par la Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase) a été effectué à l'aide d'une trousse de détection Apotag (Intergen, Purchase, NY). À titre de contrôle positif, la génistéine (200 µM) et la cytochalasine (1 µM) ont été ajoutées simultanément dans un même spécimen.

7.2 Activité de la caspase-3

L'essai servant à mesurer l'activité de la caspase-3 a été effectué tel que décrit antérieurement (Boucher et al. 2000) et en accord avec le protocole de Pharmingen (Mississauga, ON, Canada). Brièvement, les cellules ont été décollées dans un tampon de lyse contenant 50 mM de Tris-HCl, pH 7.8, 15 mM de NaCl, 20 mM de MgCl₂, 5 mM d'EGTA, 0.1 mM de PMSF, 1 µg/ml de leupeptine, 1 µM de pepstatine A et 1% de Triton X-100 pour 15 minutes à 4°C. Le matériel insoluble a été enlevé par centrifugation à 12 000 x g pour 15 minutes à 4°C. Les protéines des lysats cellulaires (30 µg) ont été incubées avec 20 µM du substrat fluorogénique de la caspase-3 (Pharmingen, Mississauga, ON, Canada) pour 2 heures à 37°C. L'AMC libéré des substrats a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde d'excitation de 380 nm et à une longueur d'onde d'émission de 460 nm pour la caspase-3.

8. Transfections transitoires et essai luciférase

Les cellules HGE-17 sous-confluentes ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits et ont été transfectées par lipofection (LipofectAMINE 2000, Invitrogen/Gibco) avec 0,5 µg du gène rapporteur 3TP-luciférase (sensible au TGFβ, car il contenait les éléments de réponse pour les SMADs) les 24 heures suivant la transfection. Les cellules ont été traitées avec 10 ng/ml de TGFβ1 ou avec un anticorps neutralisant dirigé contre le TGFβ. La journée suivante, l'activité luciférase a été mesurée en accord avec le protocole de Promega (Nepean, ON, Canada), tel que décrit antérieurement (Aliaga et al. 1999, Houde et al. 2001).

9. Vecteurs d'expression

Le vecteur d'expression pour la forme sauvage d'Akt (wtAkt) portant une étiquette Flag a été gracieusement fourni par le Dr P.H. Vachon (Université de Sherbrooke, Canada). Le vecteur d'expression pour la forme myristylée d'Akt (myrAkt) portant une étiquette HA a été gracieusement fourni par le Dr P.K. Vogt (The Scripps Research Institute, CA, USA). La forme sauvage d'Akt a été clonée après son excision à partir du vecteur pFLAG-CMV-1 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) au site BglII-Clal du vecteur rétroviral pLPCX (Clontech, BD Biosciences), en amont du promoteur du cytomégalo virus (CMV) en utilisant un adaptateur BglII-Clal (sens 5'-GATCTCGGCCAAAC-3' et antisens 5'-CATGGTTTGGCCGA-3') (Tétreault et al., 2007). MyrAkt a été cloné après son excision à partir du vecteur pCDNA3 au site HindIII du vecteur rétroviral pLPCX, en amont du promoteur du cytomégalo virus (CMV) (Tétreault et al., 2007).

10. Production virale et infections rétrovirales

Les constructions pLPCX-wtAkt, pLPCX-myrAkt et le vecteur vide pLPCX ont été utilisés pour produire les virus dans les cellules HEK293T à l'aide d'une co-transfection avec un vecteur amphotropique auxiliaire (pAmpho, gracieusement fourni par le Dr Claude Asselin, Université de Sherbrooke). Les cellules sous-confluentes ont été transfectées durant 3 heures par une méthode de lipofection en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Le milieu de culture cellulaire (Opti-MEM, Invitrogen) a été récolté 48 heures suivant la transfection et filtré à

travers des filtres Millex-HA (25 μ m, 0.45 μ m; Millipore, Bedford, MA, USA). Les cellules HGE-17 sous-confluentes ont été infectées avec la suspension virale contenant 4 μ g/ml de polybrène (Hexadimethrine bromide H-9268, Sigma-Aldrich) pour 1 heure à 37°C. Par la suite, la suspension a été complétée avec 6 ml de milieu frais contenant 4 μ g/ml de polybrène et incubée à 37°C durant 48 heures. Le pourcentage de cellules infectées de manière rétrovirale a été estimé à l'aide d'infections effectuées en parallèle à l'aide de virus exprimant le produit du gène de la protéine fluorescente verte (GFP) et a été estimé à 90-95%. Le vecteur rétroviral possède un gène de résistance à la puromycine ayant permis la sélection de populations cellulaires pures. Le milieu de culture a été changé et la sélection pour la résistance à la puromycine (0,2 μ g/ml) a été débutée 48 heures plus tard pour une période de 10 jours de façon à obtenir des populations stables.

11. Essais de phosphorylation de pp60c-Src

Les lysats de cellules HGE-17 ont été préparés dans un tampon Triton X-100 (Triton X-100 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, NaF 50 mM et glycérol 5%) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (PMSF 0.1 mM, leupeptine 10 μ g/ml, pepstatine 1 μ g/ml et aprotinine 10 μ g/ml) et des inhibiteurs de phosphatases (orthovanadate 200 μ M, β -glycérophosphate 40 mM). Les lysats ont été débarrassés de leurs débris cellulaires par centrifugation (10 000 x g, 10 minutes, 4°C). 800 μ g des échantillons dilués dans 800 μ l de tampon Triton X-100 ont été incubés 2 heures avec 4 μ g de l'anticorps

total dirigé contre pp60c-Src, suivi d'une incubation d'une heure avec la protéine G-Sépharose à 4°C. Les complexes de protéines G-Sépharose ont été lavés 2 fois avec le tampon Triton froid, puis 2 fois avec le tampon kinase (para-nitrophenylphosphate 20 mM, MgCl₂ 10 mM, dithiothreitol 1 mM et Hépès 30 mM, pH 7.4). Par la suite, les complexes de protéines G-Sépharose ont été incubés avec 40 µl de tampon kinase supplémenté avec 5 µCi d'ATP [γ -³²P] pour 30 minutes à 30°C. La réaction a été stoppée par l'addition de tampon Laemmli 4X à base de SDS (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2.3%, glycérol 10%, β -mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol 0,005%), après quoi les échantillons ont été chauffés à 95°C pour 5 minutes et analysés par SDS-PAGE sur des gels 10% en conditions réductrices. Les gels ont par la suite été soumis à une autoradiographie à -80 °C. Finalement, les protéines contenues dans le gel ont été soumises à un électro-transfert semi-sec et soumises à un immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps total dirigé contre pp60c-Src.

12. Méthode de nucléofection pour l'incorporation d'un siRNA

Les cellules HGE-17 ont été décollées par trypsinisation et centrifugées 5 minutes à 1500 x g. Par la suite, le milieu en excès a été enlevé pour obtenir un culot de cellules à partir duquel 2,5 x 10⁶ cellules ont été resuspendues dans 100 µl d'une solution de nucléofection appropriée (Solution T, Amaxa, ESBE Scientific, Markham, ON, Canada), puis mélangées avec 10 µl d'un siRNA dirigé contre ILK. Le siRNA contrôle a été obtenu de Qiagen Inc. (Mississauga, ON,

Canada; cat#1022076, séquences: sens UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT; antisens ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT) alors que le siRNA dirigé contre ILK a été obtenu d'Ambion Inc. (Austin, TX, USA, cat# 1461, séquences: sens GGGCAAUGACAUUGUCGUGtt; antisens CACGACAAUGUCAUUGCCCtg). Le programme T20 a été utilisé pour nucléofecter les cellules en accord avec le protocole d'Amaya. Par la suite, les cellules ont été resuspendues dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS et celles-ci ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits.

13. Essai kinase ILK

Les cellules blessées ont été lysées pendant 10 minutes sur glace avec 1 ml de tampon de lyse par pètri de culture (Triton X-100 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, NaF 50 mM et glycérol 5%) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (PMSF 0.1 mM, leupeptine 10 µg/ml, pepstatine 1 µg/ml et aprotinine 10 µg/ml) et des inhibiteurs de phosphatases (orthovanadate 200 µM, β-glycérophosphate 40 mM). Les cellules ont par la suite été débarrassées de leurs débris cellulaires par centrifugation (10 000 x g, 10 minutes, 4°C). 500 µg des échantillons dilués dans 500 µl de tampon Triton X-100 ont été incubés 1 heure avec la protéine A-Sépharose à 4°C (Pharmacia Upsala Biotech, Suède), après avoir été incubés durant 2 heures avec l'anticorps anti-ILK (Upstate). Les complexes protéiques ont été lavés 4 fois avec le tampon Triton froid, puis 3 fois avec le tampon kinase (para-nitrophenylphosphate 20 mM, MgCl₂ 10 mM, dithiothreitol 1 mM et Hépès 30 mM, pH 7.4). Par la suite,

les complexes protéiques ont été incubés avec 40 µl de tampon kinase supplémenté avec 5 µCi d'ATP [γ - 32 P] et du substrat MBP (Myelin Basic Protein, Upstate) pour 30 minutes à 30°C. La réaction a été stoppée par l'addition de tampon Laemmli 4X à base de SDS (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2.3%, glycérol 10%, β -mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol 0,005%), puis les échantillons ont été chauffés à 95°C pour 5 minutes et analysés par SDS-PAGE sur des gels 10% en conditions réductrices. Les gels ont par la suite été soumis à une autoradiographie à -80 °C. À noter que l'incorporation de [γ - 32 P] par la MBP a été linéaire tout au long de l'essai kinase. Finalement, les protéines contenues dans le gel ont été soumises à un électro-transfert semi-sec et soumises à un immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps total dirigé contre ILK.

14. Analyse RT-PCR

L'ARN total a été extrait en utilisant la trousse d'isolation d'ARN Totally RNA (Cederlane) et la transcription inverse a été effectuée en utilisant l'enzyme Superscript II RT (Invitrogen) et les amorces Oligos dT (Invitrogen). Le PCR a été avec les amorces suivantes : PDGFR α , 5'-TGGCTCCTGAGAGCATCTTT-3', 5'-ATTGTCCAGGCAGCAGATTTC-3'; PDGFR β , 5'-ACCTGGTGGACTACCTGCAC-3', 5'-GGAGGACTCGATGTCTGCAT-3'; S14, 5'-GGC AGA CCG AGA TGA ATC CTC A-3', 5'-CAG GTC CAG GGG TCT TGG TCC-3'. Les conditions de PCR ont produit une amplification en suivant une progression linéaire. Les

produits de PCR ont par la suite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

15. Enrichissement de membranes

Les lysats de cellules HGE-17 blessées ont été préparés dans un tampon A contenant 250 mM de sucrose (Hepes 10 mM, EGTA 2 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, leupeptine 20 µg/ml, aprotinine 20 µg/ml). Les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation à 2800 rpm pour 10 minutes. Le surnageant a par la suite été centrifugé à 65 000 rpm pour 60 minutes en utilisant un rotor TLS-55 dans une ultra-centrifugeuse TL-100. Les culots ont été resuspendus dans 200 µl de tampon A contenant 250 mM de sucrose et ont été désignés comme étant les fractions membranaires. Les fractions membranaires ont par la suite été soumises à un immunobuvardage de type Western.

16. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard, avec une significativité statistique des différences entre les conditions expérimentales établie à 95 %. Une analyse de variance ANOVA à une ou deux directions suivie d'un test post-ANOVA de Turkey et d'un test t de Student ont été utilisés pour indiquer une différence statistique entre les groupes en utilisant la version 4.0 du logiciel GraphPrism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Les analyses densitométriques des immunobuvardages de type Western ont été déterminées à l'aide du logiciel Scion Image 4.02 (Scion Corporation, Frederick, MA, USA).

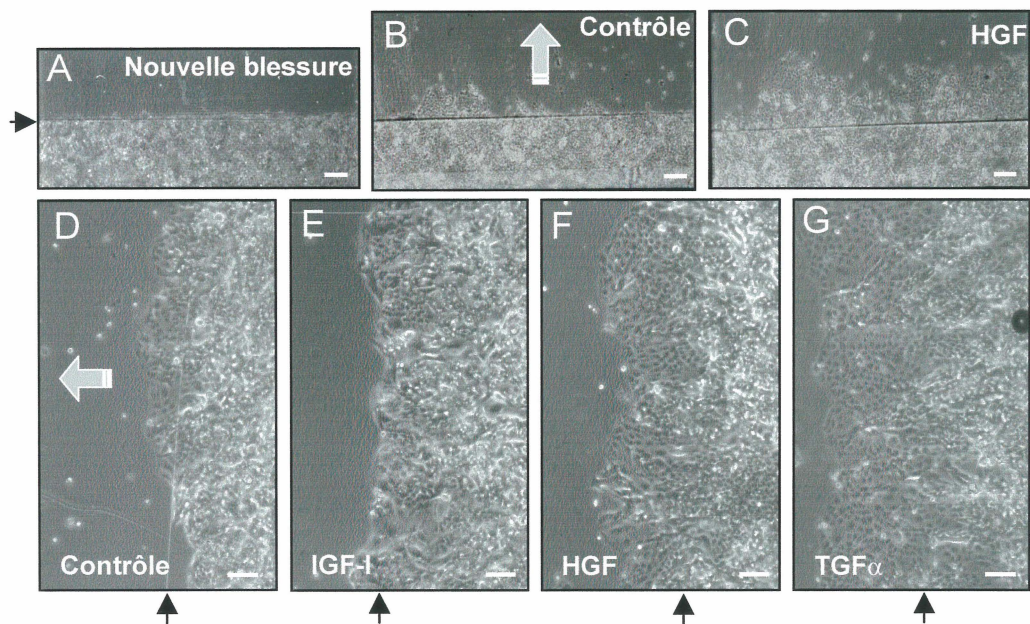
III- Résultats

1. Effet différentiel des facteurs de croissance sur l'induction et la modulation de la régénération épithéliale gastrique humaine

1.1 Dynamiques de régénération

La capacité de régénération basale des monocouches cohérentes de cellules épithéliales gastriques humaines a été évaluée suivant une blessure effectuée sur des monocouches cohérentes à l'aide d'une lame de rasoir. La Figure 17 illustre les réponses des cultures de cellules HGE-17 nouvellement confluentes et de cellules HGE-20 post-confluentes. La partie supérieure de la Figure 17 (A-C) révèle l'aspect macroscopique d'une monocouche de cellules HGE-17 fraîchement blessée (Fig.17A) ainsi que son expansion après 40 heures dans des conditions de culture réduites en sérum (0,1%) (Fig. 17, B et C). En absence de facteurs de croissance exogènes (condition basale) (Fig. 17B), les feuillets épithéliaux se déplacent lentement et de manière non-uniforme tout au long de la marge de la blessure. En effet, tel qu'illustré à la Figure 17D, le front de régénération apparaît irrégulier dans les conditions basales. Une fois la capacité de régénération basale de cellules HGE-17 établie, la capacité de réponse de l'épithélium gastrique humain à différents facteurs de croissance a été évaluée. Pour ce faire, des monocouches cohérentes de cellules épithéliales gastriques humaines ont été blessées avec une lame de rasoir, suivie par une incubation avec ou sans les facteurs de croissance suivants : EGF, TGF α , HGF,

Figure 17. Effet des facteurs de croissance HGF, IGF-I et TGF α sur la régénération des monocouches de cellules HGE blessées. Régénération d'une monocouche de cellules HGE-17 nouvellement confluentes (**A-C**) et de cellules HGE-20 à 6 jours de post-confluence (**D-G**) 40h suivant l'induction d'une large blessure à confluence et à 6 jours post-confluence respectivement. La microscopie à contraste de phase montre le mouvement d'un feuillet épithélial cohérent à travers la marge de la blessure linéaire (flèche noire): **A**, monocouche de cellules HGE-17 nouvellement blessée, **(B)** Contrôle (FBS 0,1%), **(C)** HGF 20 ng/ml. L'expansion de la monocouche de cellules HGE-20 est régulée par un traitement aux facteurs de croissance: **(D)** Contrôle (FBS 0,1%), **(E)** IGF-I 100 ng/ml, **(F)** HGF 20 ng/ml, **(H)** TGF α 50 ng/ml. Les flèches grises montrent la direction de la migration dans toutes les images de cellules en migration dans les panneaux horizontaux. Barres: 100 μ M. À noter que toutes les expériences ont été effectuées en présence de FBS 0,1%. Ces résultats sont représentatifs de trois différentes expériences.

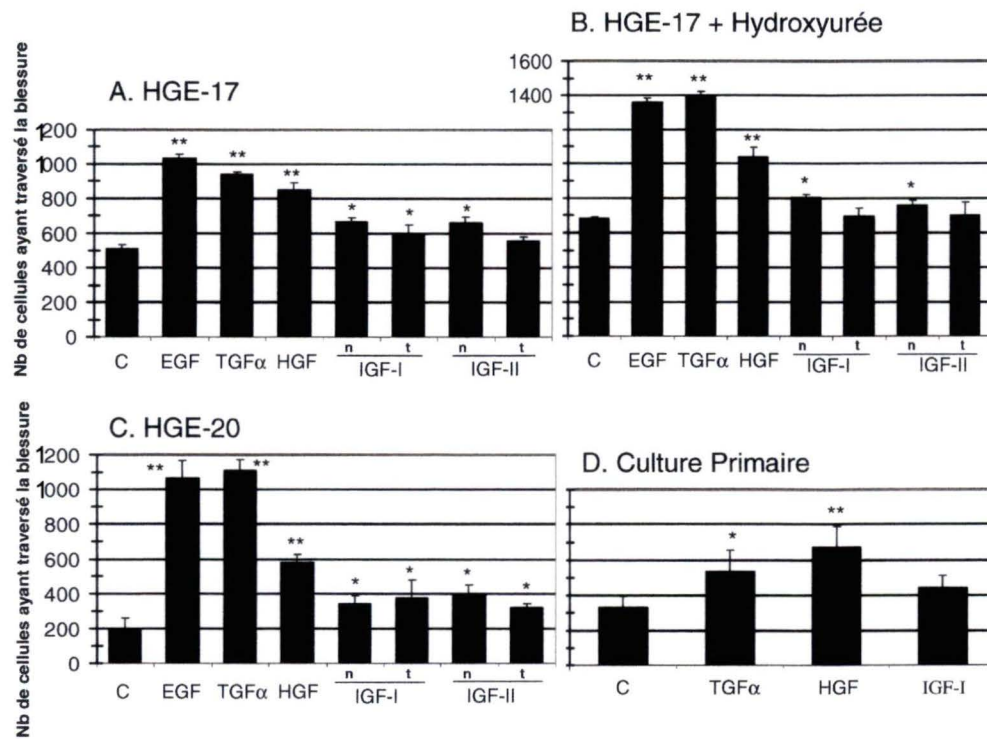


IGF-I et IGF-II. Suivant une stimulation aux facteurs de croissance, la migration est accélérée significativement (Fig. 17C, avec HGF). Des variations similaires ont été observées dans les monocouches de cellules HGE-20 post-confluentes (Fig.17, D à G). En comparaison aux conditions contrôles (Fig. 17D), le front de régénération est beaucoup plus linéaire en présence des facteurs de croissance IGFs (Fig. 17E). En ce qui a trait au HGF, le mouvement vers l'avant du feuillet cellulaire stimulé par ce facteur de croissance semble également varier de façon irrégulière (Fig. 17F). Ceci s'explique par le fait que ce mouvement est dirigé par une force d'attraction exercée par les cellules individuelles retrouvées à la marge de la blessure. Finalement, l'addition d'EGF et de $TGF\alpha$ a exercé clairement une stimulation optimale de la régénération (Fig. 17G; avec $TGF\alpha$).

1.2 Quantification de la régénération et de la restitution

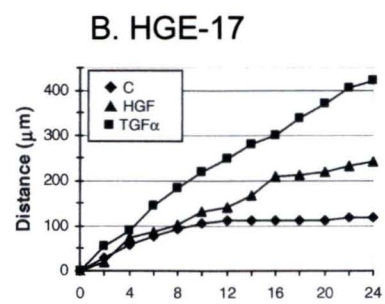
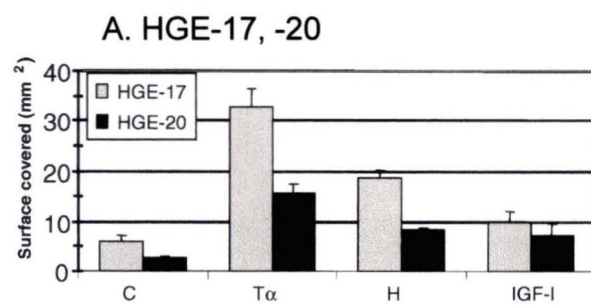
Dans les expériences contrôles effectuées sur des monocouches de cellules HGE-17, nous avons observé que le nombre de cellules ayant migré à travers la marge de la blessure est significatif de façon consistante, que ce soit en présence ou en absence d'hydroxyurée. Cet agent chimiothérapeutique qui inhibe la synthèse de déoxynucléosides triphosphates et qui arrête les cellules au pied de la phase S du cycle cellulaire nous a permis de distinguer l'activité régénératrice de monocouches de cellules HGE-17 (Fig. 18A) de manière indépendante de la croissance cellulaire, c'est-à-dire la restitution (Fig. 18B). Il est important de mentionner que l'hydroxyurée n'a pas affecté la viabilité cellulaire ou encore la migration, ce qui est en accord avec une observation

Figure 18. Quantification de la régénération et de la restitution des cellules épithéliales gastriques en présence des facteurs de croissance. La capacité de régénération et de restitution des cellules épithéliales gastriques a été déterminée 40h après l'induction d'une blessure et exprimée en tant que le nombre de cellules ayant traversé la marge de la blessure **(A-D)**. **(A)** Régénération de monocouches de cellules HGE-17 nouvellement confluentes en présence de FBS 0,1% et de facteurs de croissance. **(B)** Restitution de monocouches de cellules HGE-17 incubées en présence de FBS 0,1%, de facteurs de croissance et de 20 mM d'hydroxyurée. **(C)** Régénération de monocouches de cellules HGE-20 contenant du FBS 1% et des facteurs de croissance. **(D)** Restitution de cultures primaires d'épithélium gastrique foetal nouvellement confluentes contenant du FBS 4% et des facteurs de croissance. C, Contrôle (0,1% FBS); EGF (50 ng/ml); TGF α (50 ng/ml); HGF (20 ng/ml); IGF-I (100 ng/ml); IGF-II (100 ng/ml). Pour les IGFs, les peptides sous-forme native (n) ont été comparés avec leurs formes tronquées (t) IGFPB-indépendants **(A-C)**. Ces résultats sont représentatifs de trois ou quatre expériences différentes. Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux conditions contrôles, *P<0.005, **P<0.005.



antérieure effectuée sur des cultures primaires gastriques canines (Dignass et al., 1993). Cet effet inhibiteur sur la croissance cellulaire a été confirmé par l'observation de l'absence de marquage au Ki-67 (résultats non montrés). Plusieurs facteurs de croissance exogènes ont accéléré la réponse régénérative des cellules HGE-17 dans les deux conditions (Fig. 18A et B), soit la régénération et la restitution. Par exemple, en comparaison aux conditions contrôles, l'EGF et le TGF α ont augmenté considérablement le nombre de cellules observées le long de la marge de la blessure à des concentrations de 50 ng/ml, que ce soit en présence ou en absence d'hydroxyurée (82 % à 100% de stimulation). En accord avec ces résultats, le TGF α a augmenté de façon optimale la zone recouverte par les cellules régénératrices (Fig. 19A), en plus d'accélérer constamment la migration des cellules de type «leader» localisées à la marge de la blessure (Fig. 19B). De son côté, le HGF a aussi stimulé la migration des cellules HGE-17 à des concentrations de 20 ng/ml, (Fig. 18A et B). Lorsque la surface recouverte par les cellules en migration a été analysée, le HGF s'est avéré être 50% moins efficace que le TGF α , (Fig. 19A). De façon opposée, les facteurs de croissance IGF-I et IGF-II, à une concentration de 100 ng/ml, ont stimulé la régénération et la restitution des cellules HGE-17 beaucoup plus faiblement que les facteurs de croissance EGF/TGF α /HGF, c'est-à-dire de 18-28 % en absence d'hydroxyurée et de 18-28 % en présence de l'inhibiteur de croissance. De leur côté, en général, les analogues tronqués R³IGF-I et Del (1-6) IGF-II n'ont induit aucun effet significatif sur la régénération/restitution des cellules HGE-17 en comparaison aux conditions contrôles.

Figure 19. Quantification de la zone recouverte par les cellules régénératrices en présence des facteurs de croissance. A- B, La capacité de régénération et de restitution des cellules épithéliales gastriques a été déterminée 40h après l'induction d'une blessure et exprimée en tant que la zone recouverte par les cellules régénératrices. **A,** Surface recouverte en mm² par les cellules HGE-17 et HGE-20 en régénération. **B,** Progression linéaire de la restitution : distance des cellules à partir de la marge de la blessure (en µm) en fonction du temps (en heures) par les cellules HGE-17 en présence ou en absence de facteurs de croissance. **C,** Contrôle (0,1% FBS); TGFα (50 ng/ml); HGF (20 ng/ml); IGF-I (100 ng/ml). À noter que toutes les expériences ont été effectuées en présence de FBS 0,1%. Ces résultats sont représentatifs de trois ou quatre expériences différentes.

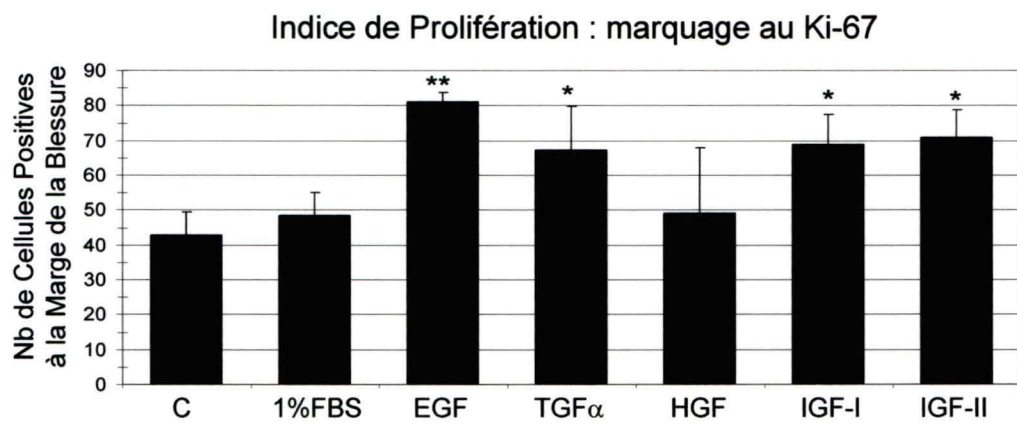


Les essais de blessure effectués sur des cellules HGE-20 à 15 jours de post-confluence (Fig. 18C) et sur des cultures primaires de cellules épithéliales gastriques fœtales humaines normales ont donné des résultats similaires à ceux obtenus avec les cellules HGE-17. Cependant, dû à leur statut plus différencié, la migration des cellules HGE-20 a été moins intense, bien que celles-ci aient répondu très fortement à une stimulation aux facteurs de croissance EGF/TGF α (stimulation de 3,7 fois). De plus, la surface recouverte par le feuillet épithélial de cellules HGE-20 s'est avérée être la moitié de celle occupée par les cellules HGE-17 et ce, à la fois dans les conditions basales et supplémentées avec les facteurs de croissance exogènes (Fig. 19A). Conséquemment, la lignée HGE-17 a été choisie comme modèle de prédilection pour effectuer nos essais de régénération et de restitution. Finalement, les cultures primaires de cellules épithéliales gastriques fœtales normales ont aussi été sensibles aux facteurs de croissance TGF α et HGF, mais ont été insensibles aux IGFs.

1.3 Prolifération cellulaire et apoptose

Dans les monocouches de cellules HGE-17 en régénération, les premières cellules prolifératives positives au Ki-67 sont apparues seulement à la fin de la première journée d'incubation et dans les conditions contrôles, leur nombre est resté faible jusqu'à 40 heures suivant l'induction de la blessure. Pour être plus précis, moins de 1 % des cellules régénératrices ont été estimées comme étant entrées dans le cycle cellulaire (rarement une cellule positive a pu être identifiée dans la monocouche confluyente adjacente à la blessure). De plus, l'addition

Figure 20. Effet des facteurs de croissance HGF, IGF-I, IGF-II, EGF et TGF α sur la prolifération des monocouches de cellules HGE blessées. L'index de prolifération a été déterminé après 40h par le dénombrement des cellules positives pour le Ki-67 à travers la marge de la blessure de monocouches de cellules HGE-17. C, Contrôle (FBS 0,1%); EGF (50 ng/ml); TGF α (50 ng/ml); HGF (20 ng/ml); IGF-I (100 ng/ml); IGF-II (100 ng/ml). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences différentes. Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles, *P<0.005, **P<0.005.

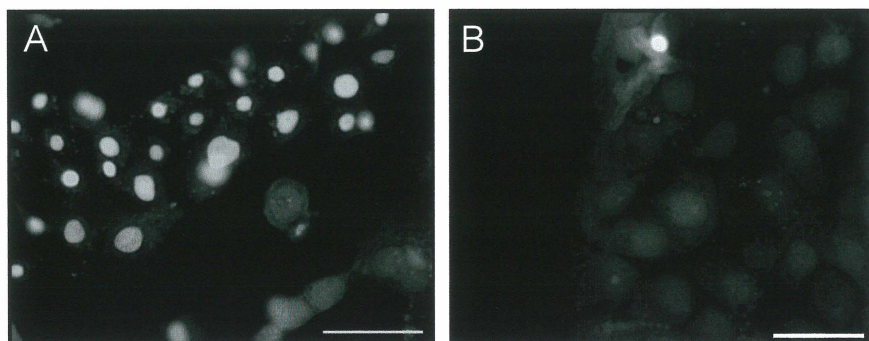


subséquente d'hydroxyurée a complètement inhibé l'apparition de cellules en mitose (résultat non montré), sans toutefois altérer la morphologie cellulaire ou la migration, confirmant ainsi la validité de l'utilisation de cet agent pharmacologique dans les essais de restitution. Par conséquent, les cinétiques de croissance ont été évaluées par le dénombrement des noyaux positifs pour le Ki-67. Un traitement aux facteurs de croissance a augmenté le nombre de cellules positives marquées au Ki-67 tel que démontré par l'index de prolifération (Fig. 20). En effet, à une concentration de 50 ng/ml, l'EGF a doublé le nombre noyaux positifs au Ki-67, alors que le TGF α (50 ng/ml) et l'IGF-I (100 ng/ml) ont stimulé la prolifération cellulaire par 58 % et 67 % respectivement. D'un autre côté, l'apoptose s'est avérée être un événement mineur suivant l'induction d'une blessure épithéliale. En effet, la proportion de cellules apoptotiques révélée par la méthode de TUNEL s'est avérée être extrêmement faible dans les monocouches en régénération en comparaison aux spécimens traités aux agents inducteurs d'apoptose, c'est-à-dire la cytochalasine D et la génistéine (Fig. 21).

1.4 Un mécanisme TGF β -indépendant

Tel qu'illustré à la Figure 22, l'addition exogène de TGF β 1 n'a exercé aucun effet significatif sur la restitution des monocouches de cellules HGE-17 (Fig. 22A), de cellules HGE-20 (résultat non montré) et de cultures primaires (Fig. 22B). De plus, le TGF α et le HGF ont accéléré la restitution des cellules HGE et des cultures primaires de façon similaire et ce, malgré la présence ou l'absence d'un

Figure 21. Évaluation de la viabilité des cellules HGE-17 blessées en en absence ou en présence de génistéine et cytochalasine D. Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, en présence **(A)** ou en absence **(B)** de cytochalasine D (1 μ M) + génistéine (200 μ M). Les cellules ont été fixées avec de la formaldéhyde et perméabilisées avec 0,1% de Triton avant de procéder aux marquages ISEL servant à la détection des noyaux apoptotiques. Les images représentatives de fluorescence sont montrées. Barres, 50 μ m.



anticorps neutralisant pan-spécifique du TGF β (10 μ g/ml). Il est important de noter que cette absence de réponse des cellules gastriques suite à un traitement au TGF β 1 ne peut être attribuée au manque d'expression du récepteur au TGF β ou à une défectuosité des voies de signalisation intracellulaires activées par la liaison du ligand à son récepteur. En effet, le récepteur au TGF β de type-II est bel et bien présent dans les cellules HGE-17 sous-confluentes, aussi bien que dans les monocouches de cellules post-confluentes (Fig. 22C). De plus, l'induction TGF β -dépendante du gène rapporteur spécifique 3TP-luciférase dans les cellules HGE-17 suivant un traitement au TGF β a été abrogée par l'addition d'un anticorps neutralisant TGF β pan-spécifique (Fig. 22D). Ces résultats établissent donc que le TGF β n'influence pas le processus de restitution épithéliale gastrique et que les effets des facteurs de croissance sont spécifiques et non TGF β -dépendants.

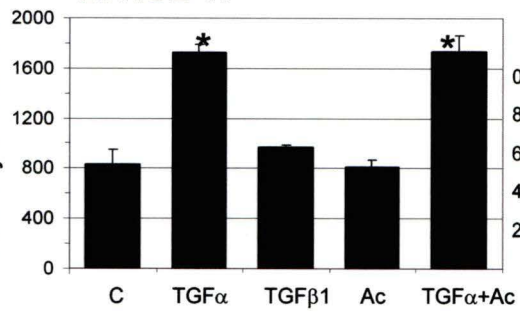
1.5 Altération de la morphologie épithéliale

Nous avons observé que les facteurs de croissance altèrent différemment la morphologie de cellules gastriques en régénération. Dans les expériences initiales effectuées au niveau des cultures primaires, les observations microscopiques routinières avaient permis de soupçonner que les facteurs de croissance EGF/TGF α /HGF stimulaient l'étalement cellulaire et la dispersion de cellules individuelles, ce qui n'était pas le cas pour les IGFs. C'est pourquoi une analyse plus en profondeur de l'effet de ces facteurs de croissance a été effectuée sur des monocouches de cellules HGE-17 à l'aide d'un marquage

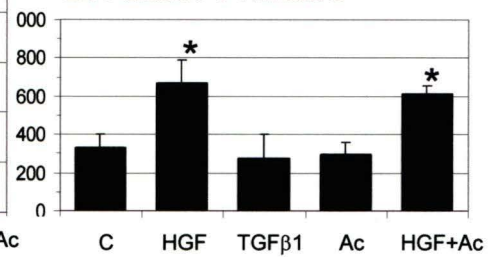
Figure 22. La restitution des monocouches de cellules HGE blessées se fait de manière indépendante du TGF β . **A**, Restitution des monocouches de cellules HGE-17 en présence de FBS 0,1%, d'hydroxyurée 20 mM et de facteurs de croissance. **B**, Restitution des cultures primaires d'épithélium gastrique foetal humain en présence de FBS 4% et de facteurs de croissance. Le nombre de cellules ayant migré à travers la marge de la blessure en absence ou en présence d'un anticorps neutralisant pan-spécifique dirigé contre le TGF β (Ac) a été déterminé après 40 heures suivant l'induction d'une blessure. **C**, Analyse de l'expression du récepteur au TGF β de type II par immunobuvardage de type Western dans des cellules HGE-17 à : sous-confluence (sc), 1, 4 et 10 jours de post-confluence. **D**, Activité du gène rapporteur 3TP-luciférase. Les cellules HGE-17 ont été transfectées par lipofection (LipofectAMINE 2000, Invitrogen/Gibco) avec 0,5 μ g du gène rapporteur 3TP-luciférase les 24 heures suivant la transfection. Les cellules ont été traitées avec 10 ng/ml de TGF β 1 ou avec un anticorps neutralisant dirigé contre le TGF β . La journée suivante, l'activité luciférase a été mesurée. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences différentes. C, Contrôle; TGF β 1 (5 ng/ml); TGF α (50 ng/ml); HGF (20 ng/ml); Ac (10 μ g/ml). Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles, *P<0.005 ou pour le TGF β 1 seul, *P<0.05.

Nb de cellules ayant traversé la blessure

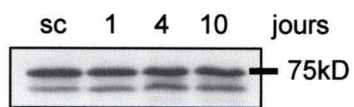
A. HGE-17



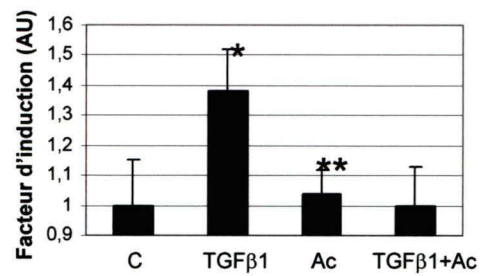
B. Culture Primaire



C. TGF β -RII

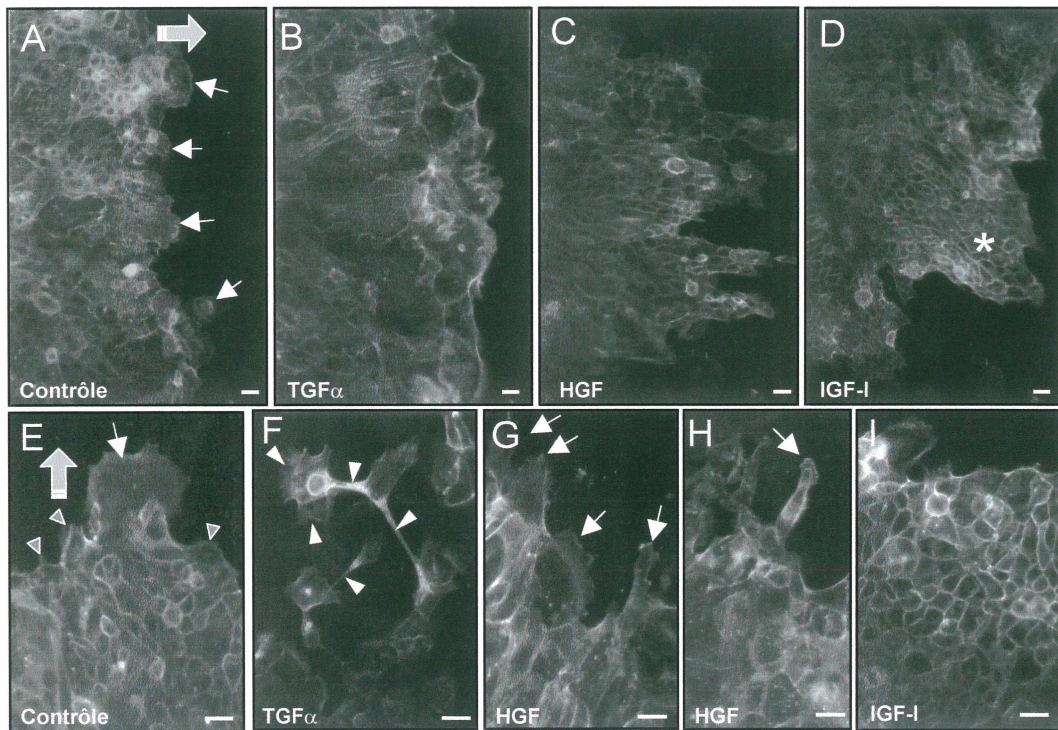


D. Gène rapporteur 3TP-Luciferase



de l'actine-F en utilisant la phalloïdine-FITC et ce, après 40 heures suivant l'induction d'une blessure (Fig. 23, A à D grossissement 20x, E à I grossissement 40x). Dans les conditions basales, le mouvement local du feuillet épithélial semble être relié à la transformation de certaines cellules bordant la blessure en épithéliocytes spécialisés de type «leader» exhibant une morphologie similaire au type fibroblastique (Fig. 23, A et E). De plus, l'ajout subséquent d'EGF ou de $TGF\alpha$ intensifie dramatiquement l'étalement cellulaire, augmentant ainsi de sept fois la taille de plusieurs cellules individuelles constituant le front de régénération (Fig. 23B). L'EGF et le $TGF\alpha$ ont aussi activé la dispersion des cellules <<leader>> (perte des contacts cellule-cellule), en plus d'activer la formation de plusieurs longues protrusions ou lamellipodes (Fig. 23F, voir têtes des flèches). En comparaison, le HGF n'a pas stimulé l'étalement cellulaire aussi intensément que l'EGF et le $TGF\alpha$, mais a plutôt stimulé l'élongation ou l'étirement de groupement de cellules plus distales de type suiveuse (Fig. 23C). L'HGF a aussi activé la dispersion et la formation de lamelle, généralement constitué d'une simple protrusion, dans les cellules pionnières de type «leader» (Fig. 23, G et H, voir flèches). D'un autre côté, les facteurs de croissance exogènes IGF-I et IGF-II n'ont pas induit les mêmes altérations morphologiques. En effet, le front de migration de la monocouche est plutôt resté compact avec la préservation du phénotype épithélial et de contacts cellule-cellule et ce, même dans les prolongements cohérents de cellules en migration à la marge de la blessure (Fig. 23, D et I, voir astérisque). La Figure 24 illustre le nombre de cellules exhibant une activité protrusive intense dans une blessure au niveau des cellules HGE-17.

Figure 23. Évaluation de la forme cellulaire et de la motilité par le marquage de l'actine-F. Les monocouches de cellules HGE-17 ont été blessées et fixées à la formaldéhyde après différents intervalles de temps suivant l'induction de la blessure. L'actine-F a été visualisée par fluorescence suite à l'utilisation de la phalloïdine-FITC. Les variations phénotypiques ont été observées dans des monocouches de cellules HGE-17, 40 heures suivant une blessure. **(A, E)** Dans les contrôles (0,1% FBS), la majorité des cellules ont préservé leurs contacts cellule-cellule, incluant les cellules de type «leader» (**A**, flèches minces). **(B, F)** En présence de 50 ng/ml de TGF α (ou d'EGF), la surface cellulaire de plusieurs cellules de type «leader» et «follower» augmente de manière considérable (**B**) dû à un étalement cytoplasmique intense. Certaines cellules «leader» sont dispersées et exhibent de multiples lamellipodes tout au long de la périphérie cellulaire (**F**, pointe de flèche). **(C, G, H)** En présence d'HGF (20 ng/ml), les cellules «leader» et «follower» s'allongent vers la zone de la blessure (**C**) et les cellules «leader» exhibent généralement une large lamelle en extension (**G** et **H**, flèches). **(D, I)** En présence d'IGF-I (100 ng/ml) (ou d'IGF-II), le front de régénération reste compact (**I**) et contient quelques groupes de cellules en migration active (**D**, astérisque). Les flèches rayées grises indiquent la direction de la migration dans toutes les images situées dans les panneaux horizontaux. Barres, 50 μ M.

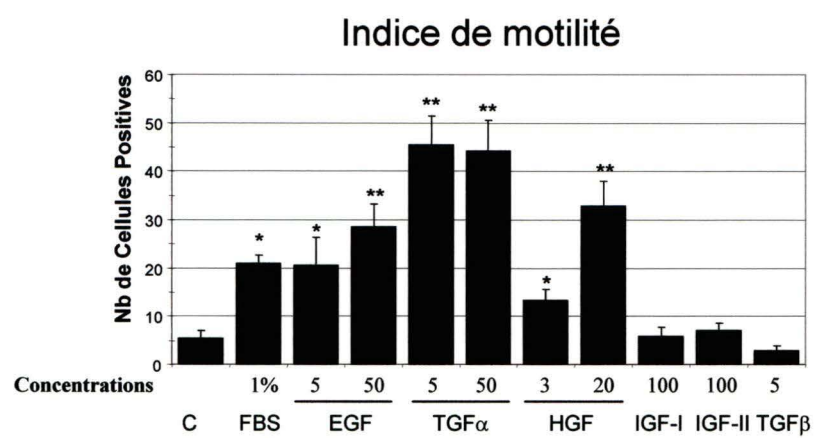


Il est également important de mentionner que cet événement spécifique a été stimulé à la fois par des concentrations faibles et élevées d'EGF/TGF α /HGF et ce, de manière hautement reproductible dans toutes les expériences.

La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour détailler les effets des facteurs de croissance sur l'ultrastructure des cellules HGE (Fig. 25). La microscopie électronique à balayage a permis de révéler que la persistance des contacts cellule-cellule, l'aplatissement de cellules et la formation de filopodes sont des caractéristiques communes aux cellules bordant la blessure dans des conditions basales, c'est-à-dire en absence de facteurs de croissance exogènes (Fig. 25, A et C). Seulement un faible nombre de cellules «leader» exhibent de longues protrusions ou lamellipodes dans des conditions basales réduites en sérum. Plusieurs groupements de cellules s'allongeant en direction de la blessure ont été observés en présence du facteur de croissance HGF, ce qui est indicatif d'un mouvement directionnel (Fig. 25D). Tel qu'il a été mentionné auparavant, l'EGF et le TGF α ont stimulé l'étalement cytoplasmique (Fig. 25E) et ont activé la dispersion de cellules individuelles exhibant la plupart du temps d'étroites extensions non orientées le long de leur périphérie (Fig. 25F). Finalement, les données de microscopie électronique suggèrent que les effets de l'IGF-I et de l'IGF-II sur le maintien de la morphologie épithéliale résultent d'une stimulation de l'alignement des cellules bordant la blessure durant les premières heures d'incubation (Fig. 25B, voir têtes de flèches).

Figure 24. Effet des facteurs de croissance HGF, IGF-I, IGF-II, EGF et TGF α sur l'indice de motilité des monocouches de cellules HGE blessées.

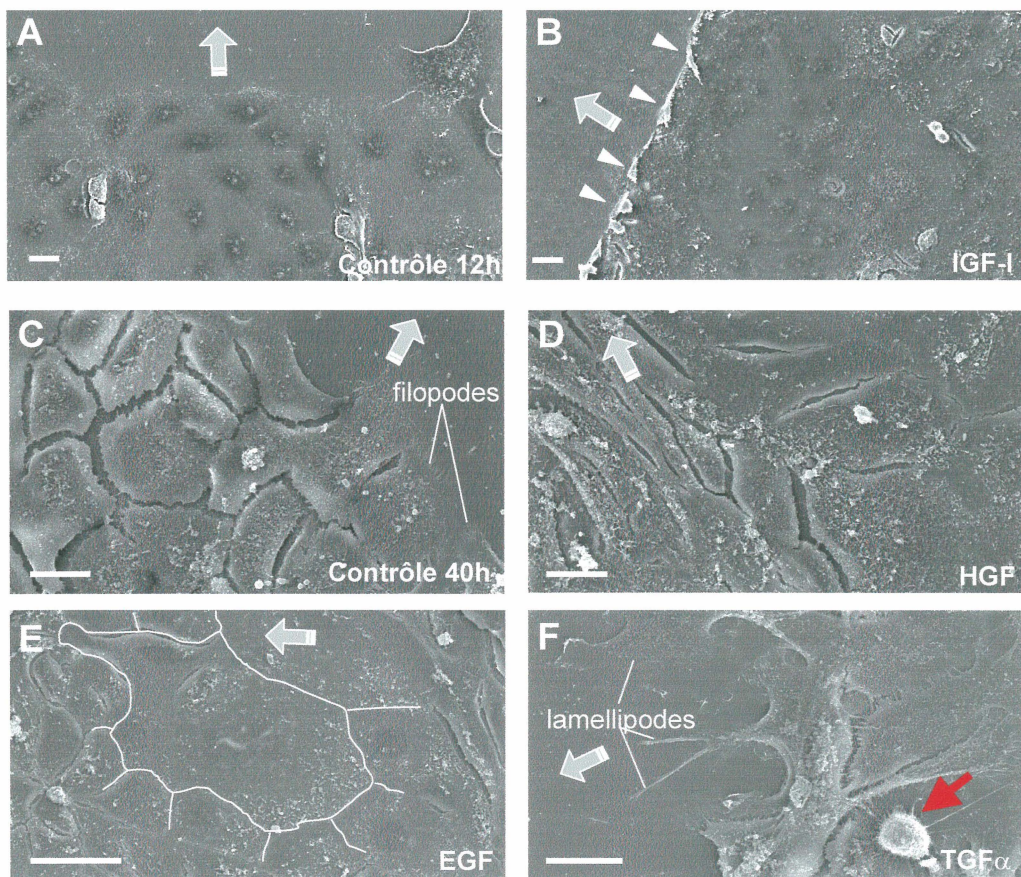
L'indice de motilité a été déterminé par le dénombrement des cellules arborant au moins une large lamelle en extension par blessure. Les concentrations des facteurs de croissance sont fournies en ng/ml (C, Contrôle). Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles, *P<0.005, **P<0.005.



1.6 Jonctions épithéliales

Comme le statut fonctionnel des jonctions cellule-cellule est d'une importance prépondérante pour l'épithélium en régénération, l'expression de la composante des jonctions adhérentes cadhérine-E et des composantes des jonctions serrées occludine et ZO-1 a été examinée. Les expériences d'immunobuvardage de type Western effectuées sur des cultures de cellules HGE-17 (Fig. 26) ont révélé que le niveau des protéines jonctionnelles cadhérine-E, ZO-1 et occludine ne varie pas de façon significative suivant une blessure, en présence ou en absence de traitements aux facteurs de croissance (en comparaison aux niveaux de la cytokératine-18). Toutefois, tel qu'escompté, la localisation subcellulaire des différentes protéines jonctionnelles a été modulée en présence des facteurs de croissance. En effet, le marquage immunofluorescent pour les protéines ZO-1 et occludine est localisé de façon prédominante aux sites des contacts cellule-cellule dans les conditions basales, alors que celui-ci est relocalisé dans le cytoplasme des cellules en migration à la marge de la blessure des cellules stimulées au $TGF\alpha$ (résultat non montré). La Figure 27 illustre bien ces effets régulateurs au niveau de la protéine jonctionnelle cadhérine-E. À faible grossissement (10x), l'intensité du marquage de la cadhérine-E semble diminuer dans les cellules traitées au $TGF\alpha$ (Fig. 27B) ou au HGF (Fig. 27C), en comparaison aux conditions contrôles (Fig. 27A) ou aux traitements à l'IGF-I (Fig. 27D). Ce changement des niveaux d'intensité de la protéine a été associé à l'étalement et à l'étirement de cellules causés par l'ajout de ces facteurs de croissance (Fig. 27, F et G). D'un autre côté, le marquage de la cadhérine-E

Figure 25. Évaluation de la morphologie cellulaire durant la migration des monocouches de cellules HGE blessées. Les observations ultrastructurales des monocouches de cellules HGE-17 en régénération 12 heures (A, B) et 40 heures (C-F) suivant une blessure ont été effectuées par microscopie électronique à balayage. A, Dans les contrôles (0,1 % FBS) 12h, les cellules bordant la blessure commencent lentement à s'étaler alors que la présence d'IGF-I (100 ng/ml) (ou d'IGF-II) (B) cause déjà l'alignement de plusieurs cellules bordant la blessure (pointes de flèches blanches) et maintient le front de régénération dans un état beaucoup plus compact. C, Dans les contrôles 40h, les cellules bordant la blessure apparaissent beaucoup plus aplaties et exhibent des filopodes plutôt que des structures migratoires. D, La présence d'HGF (20 ng/ml) entraîne l'élongation de plusieurs cellules régénératrices. E-F, L'EGF ou le TGF α (50 ng/ml) induisent un étalement cytoplasmique intense (E) et la formation de multiples lamellipodes (F). La flèche blanche pointe vers une cellule en division. Les flèches rayées indiquent la direction de la migration dans chaque image. La flèche rouge pointe vers une cellule en division. Barres, 50 μ M.



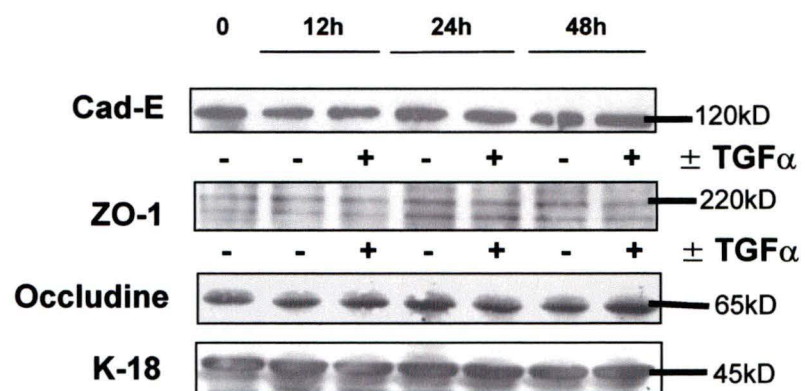
semble être plus intense dans la condition contrôle (Fig. 27E) ou dans les cellules traitées à l'IGF-I (Fig. 27H), dû au fait que celles-ci exhibent une morphologie beaucoup plus compacte. Finalement, la redistribution de la cadhérine-E ne survient que dans un sous-ensemble de cellules bordant la blessure (Fig. 27I, voir astérisques), alors que celle-ci disparaît éventuellement en réponse aux facteurs de croissance (Fig. 27J, avec TGF α , voir têtes de flèches).

2. L'activation dépendante de la PI3K par le récepteur à l'EGF promeut la restitution des monocouches épithéliales gastriques humaines blessées

2.1 Les voies de signalisation dépendantes de la PI3K contrôlent la migration de cellules épithéliales gastriques

Dans un premier temps et dans le but de mieux comprendre comment les facteurs de croissance régulent la restitution épithéliale gastrique humaine, plusieurs voies de signalisation intracellulaires connues pour être associées aux réponses aux facteurs de croissance ont été examinées. C'est pourquoi la première voie ayant été investiguée a été la cascade de signalisation bien connue Ras/MAP Kinase. Pour ce faire, des cellules HGE-17 confluentes ont été blessées de façon linéaire à maintes reprises et des lysats cellulaires ont été préparés à différents intervalles de temps. Ces extraits ont par la suite été incubés en présence d'un anticorps polyclonal spécifique pour la détection des isoformes de ERK1/2 retrouvées sous forme phosphorylée et active. En guise

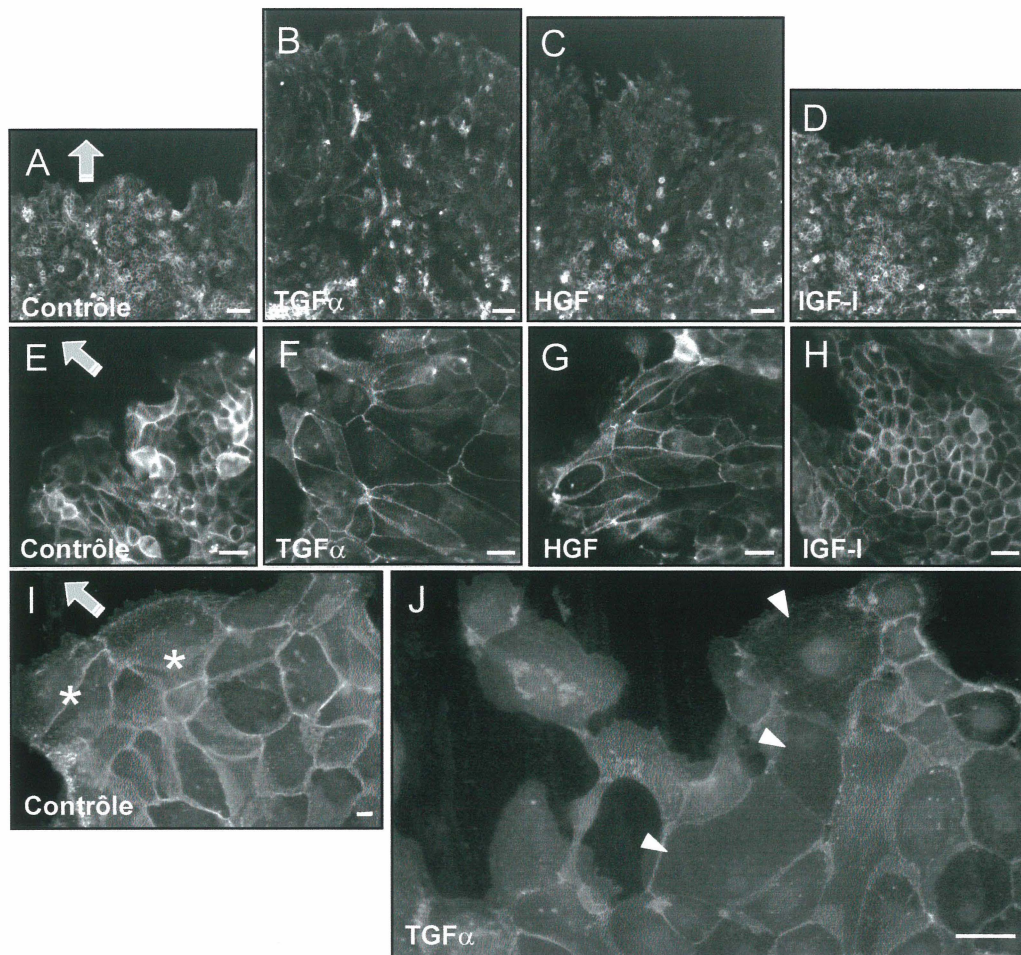
Figure 26. Expression des protéines de jonctions de type épithélial dans les monocouches de cellules HGE-17 en régénération. Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées de manière linéaire à plusieurs reprises, puis traitées avec de l'hydroxyurée 20 mM, en présence ou en absence de TGF α (50 ng/ml). Les cellules ont été lysées aux différents intervalles de temps. 50 μ g de lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE et les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western. Les expériences d'immunobuvardage de type Western révèlent l'expression des protéines cadhérine-E (Cad-E), ZO-1 et occludine. Un chargement égal des protéines d'une piste à l'autre a été confirmé à l'aide de la kératine-18.



de contrôle, correspondant au temps zéro dans nos expériences, des cellules confluentes n'ayant subi aucune blessure ont été lysées directement dans le pétri de culture. Tel qu'illustré à la Figure 28 (A et B), les activités de ERK1/2 enregistrées dans les monocouches de cellules HGE-17 au temps zéro ont augmenté après seulement 5 minutes suivant l'induction d'une blessure épithéliale, cette activité demeurant soutenue pour une période d'au moins 6 heures. De plus, il est important de mentionner que l'addition du facteur de croissance TGF α a quant à elle augmenté la magnitude de l'activation de ERK1/2.

Comme les facteurs de croissance sont également pour déclencher l'activation de la voie de signalisation de la PI3K, nous avons analysé l'effet de l'induction d'une blessure épithéliale gastrique sur l'activation de la kinase Akt, un effecteur de cette voie. Tel qu'illustré à la Figure 28A (panneau de gauche), l'utilisation d'un anticorps polyclonal spécifique à la détection d'Akt sous forme phosphorylée et active a permis de démontrer que l'induction d'une blessure épithéliale augmente significativement les niveaux de phosphorylation d'Akt après seulement une période d'incubation de 15 minutes, cette activation restant soutenue pour une période d'au moins 16 heures. Encore une fois, l'addition de TGF α a stimulé la stimulation d'Akt, mais cette fois-ci a diminué la durée de la phosphorylation de la kinase à environ 8 heures (Fig. 28, A et B).

Figure 27. Expression et localisation de la cadhérine-E dans des monocouches de cellules HGE-17 en régénération. Les monocouches de cellules HGE-17 ont été blessées et fixées à la formaldéhyde après 40 heures suivant l'induction de la blessure. Les cellules ont par la suite été incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre la cadhérine-E, puis avec l'anticorps secondaire conjugué au FITC. L'expression et la localisation de la cadhérine-E ont été observées dans des monocouches de cellules HGE-17, 40 heures suivant une blessure. **(A-D)** À faible et à moyen grossissement, l'expression de la cadhérine-E est principalement associée avec les contacts cellule-cellule dans les contrôles **(A, E)** et en présence d'IGF-I (100 ng/ml) **(D, H)**. La densité du marquage diminue en présence des facteurs de croissance stimulant l'étalement cytoplasmique : TGF α (50 ng/ml) **(B, F)** et HGF (20 ng/ml) **(C, G)**. **(I, J)** À plus fort grossissement, la cadhérine-E est principalement associée avec les contacts cellule-cellule dans les cellules contrôles en régénération et est redistribuée vers une localisation intracellulaire dans les cellules bordant la blessure **(I, astérisque)**. Un traitement au TGF α réduit davantage le marquage et cause la disparition de la cadhérine-E dans certaines cellules aplaties **(J, pointes de flèches blanches)**. Les flèches rayées indiquent la direction de la migration dans toutes les images situées dans les panneaux horizontaux. Barres, 50 μ M.

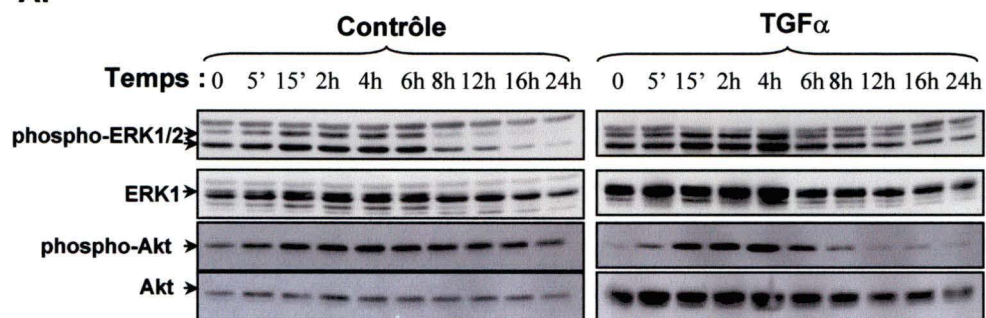


Dans le but d'investiguer l'importance de la PI3K et des ERK1/2 dans la restitution épithéliale gastrique humaine, l'impact de l'inhibition pharmacologique de ces deux voies de signalisation a été évalué sur la migration de monocouches de cellules HGE-17, en présence ou en absence du facteur de croissance TGF α . L'inhibition de l'activité de la PI3K à l'aide du LY294002 a aboli les niveaux de phosphorylation d'Akt (Fig. 29B) et a résulté en une diminution marquée de la migration des cellules HGE-17 en condition basale ou suivant une stimulation au TGF α (Fig. 29, A et B). Il est également intéressant de noter que l'incubation des cellules HGE-17 avec l'inhibiteur de la PI3K au cours de la première heure seulement suivant l'induction d'une blessure a été suffisante pour réduire de manière significative la migration cellulaire basale, indiquant ainsi une implication précoce de la PI3K dans le processus de restitution épithéliale (Fig. 29B, graphique de gauche). L'implication de la PI3K a également été supportée par la démonstration que l'addition du LY294002 a fortement inhibé la phosphorylation d'Akt (Fig. 29B, graphique de gauche). De façon contraire, l'inhibition de la voie de signalisation MEK/ERK1/2 (PD98059) n'a eu aucun effet significatif sur la migration des cellules HGE-17 en condition basale ou stimulée au TGF α (Fig. 29, A et B) et ce, malgré le fait que l'addition du PD98059 a bel et bien été en mesure d'inhiber la phosphorylation de ERK1/2 (Fig. 29B).

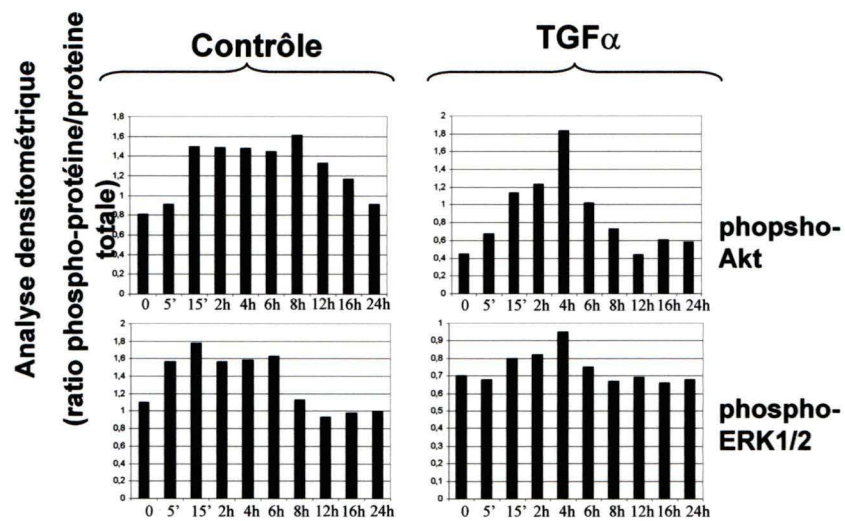
Par la suite, la possibilité que la stimulation des voies de signalisation dépendantes de la PI3K par elle-même soit suffisante pour le déclenchement de la migration des cellules gastriques humaines a été vérifiée en traitant les

Figure 28. Rôle de la PI3K et des MAP Kinases ERK1/2 dans la restitution des cellules épithéliales gastriques humaines. **A,** Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées de manière linéaire à plusieurs reprises, puis traitées avec de l'hydroxyurée 20 mM, en présence ou en absence de TGF α (50 ng/ml). Les cellules ont été lysées aux différents intervalles de temps. 50 μ g de lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE et les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western dans le but de déterminer les niveaux d'expression d'Akt et de ERK1/2 sous-forme totales et phosphorylées. Les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 ont été analysés à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement ERK1/2 phosphorylés sur la thréonine 202 et sur la tyrosine 204 (phospho-ERK1/2). La phosphorylation d'Akt a été analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement Akt phosphorylé sur la sérine 473. **B,** Analyses densitométriques des expériences d'immunobuvardage de type Western effectuées en A. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences.

A.



B.



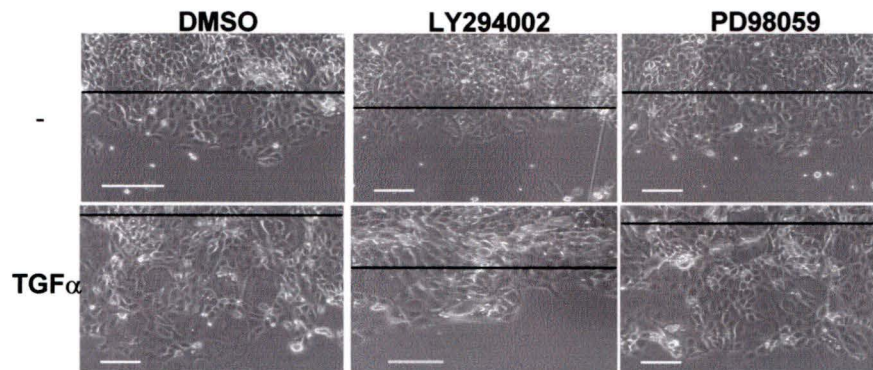
cellules avec un composé synthétique membrane-perméable de $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, un des produits lipidiques de la PI3K agissant comme un second messenger. Tel que démontré à la Figure 29C, le $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ a stimulé la migration des cellules HGE-17 par 235 % après 40 heures, une stimulation qui est comparable à celle observée suivant un traitement au facteur de croissance $\text{TGF}\alpha$.

Finalement, puisque les cellules HGE-17 sont dérivées de la lignée cellulaire de carcinome gastrique humaine NCI-N87 (Chailler et Ménard, 2005), il était extrêmement important de valider les résultats décrits ci-dessus au niveau d'un modèle de cellules épithéliales gastriques humaines normales. Le rôle de la PI3K dans la régulation de la migration de cellules épithéliales gastriques humaines a ainsi été examiné dans les cultures primaires de cellules épithéliales gastriques humaines. Tel qu'attendu, l'inhibition de l'activité de la PI3K avec le LY294002 a atténué fortement la migration cellulaire en présence ou en absence de $\text{TGF}\alpha$ (Fig. 29D). Par conséquent, l'utilisation de cultures primaires a clairement confirmé l'importance prépondérante de la PI3K sur la migration cellulaire épithéliale gastrique humaine et validé la lignée cellulaire HGE-17 comme modèle d'étude.

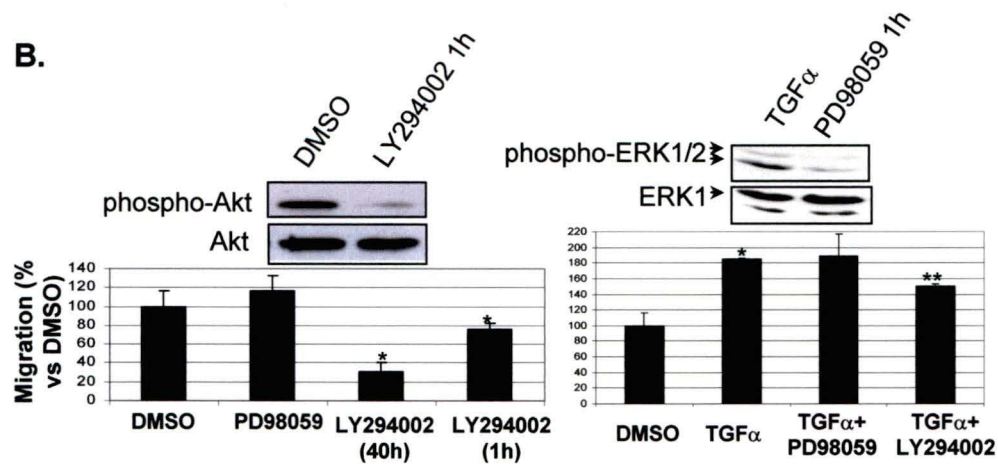
2.2 La signalisation via le récepteur à l'EGF (EGFR) est nécessaire à la migration cellulaire gastrique en condition basale et stimulée au $\text{TGF}\alpha$

Figure 29. La signalisation via la PI3K est nécessaire pour la migration cellulaire gastrique basale ou stimulée au TGF α . **A,** Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, en présence ou en absence de TGF α (50 ng/ml). Dans certaines expériences, les cellules ont aussi été traitées aux temps indiqués avec 20 μ M de PD98059 ou 5 μ M de LY294002. Après 40h, le mouvement du feuillet épithélial cohérent à travers la marge de la blessure (flèche noire) peut être observé. Des images représentatives de microscopie à contraste de phase sont montrées. Barres, 200 μ M. **B,** Une quantification de quatre différentes expériences est montrée (graphiques). Les cellules ont été lysées suivant une blessure en présence de PD98059 (20 μ M) ou de LY294002 (5 μ M) et les protéines ont été analysées par immunobuvardage pour déterminer les niveaux d'expression d'Akt et de ERK1/2 sous-forme totales et phosphorylées. **C,** Les cellules HGE-17 nouvellement confluentes ont été blessées et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, en présence ou en absence de PtdIns (3,4,5) P₃ (10 mM) ou de TGF α (50 ng/ml). Après 40h, le nombre de cellules ayant migré à travers la marge de la blessure a été compté. **D,** Les cultures primaires de cellules épithéliales gastriques humaines ont été blessées et traitées avec du TGF α 50 ng/ml, en présence ou en absence de LY294002 (5 μ M). La restitution a été déterminée après 40h en tant que le pourcentage de variation du nombre de cellules ayant traversé la blessure en comparaison aux contrôles. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences. Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles, *P<0.05 ou pour le TGF α , **P<0.05.

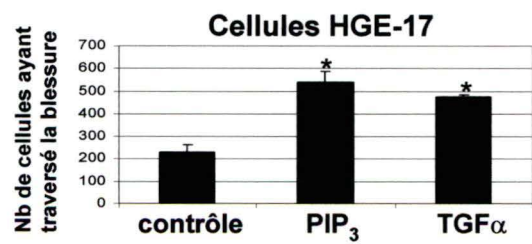
A.



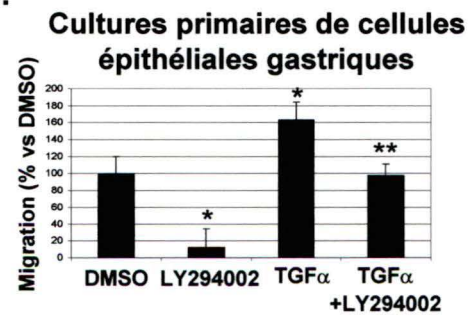
B.



C.



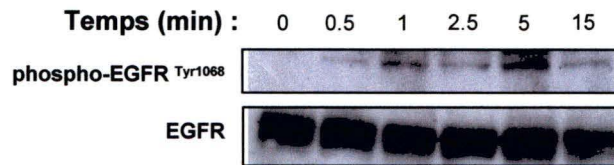
D.



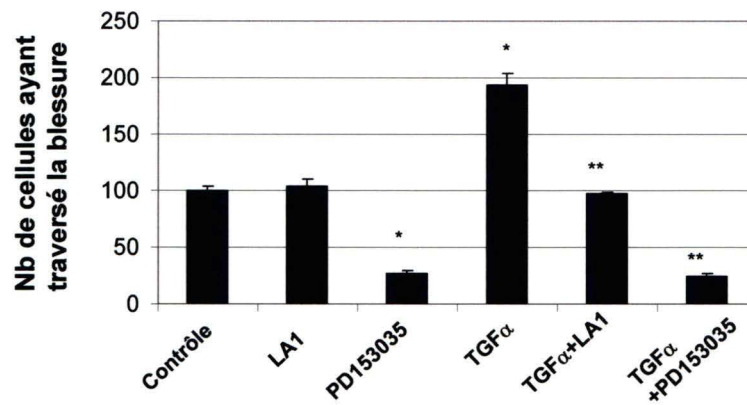
Dans les expériences contrôles effectuées dans des conditions réduites en sérum (conditions basales), le nombre de cellules en migration ayant traversé la marge de la blessure s'est avéré être extrêmement significatif (Fig. 29, A et B). Puisque le TGF α a été montré comme étant le plus puissant stimulateur de la régénération épithéliale gastrique humaine *in vitro* (Tétreault et al., 2005) et que l'EGFR a été impliqué dans l'induction de la migration cellulaire de plusieurs types de cellules épithéliales (Block et al., 2004; Puddicombe et al., 2000; Tarnawski et al., 2001; Wells, 1999), nous avons par conséquent examiné comment l'EGFR était activé dans des conditions basales (faibles concentrations de sérum) suivant l'induction d'une blessure. Pour ce faire, des cellules HGE-17 ont été blessées de façon linéaire à plusieurs reprises et les extraits ont par la suite été préparés à différents intervalles de temps. Ces extraits ont ensuite été incubés en présence d'un anticorps polyclonal reconnaissant la forme phosphorylée de l'EGFR au niveau de la Tyr¹⁰⁶⁸, un site d'autophosphorylation majeur suivant l'activation du récepteur par ses ligands extracellulaires (Rojas et al., 1996). Tel qu'illustré à la Figure 30A, suivant une blessure dans des conditions basales, l'EGFR est rapidement activé, avec un pic de stimulation maximal observé après 5 minutes. Dans le but de vérifier si l'activation du récepteur est essentielle à la migration des cellules gastriques, un inhibiteur de la kinase EGFR, le PD153035, a été ajouté aux monocouches épithéliales blessées. Cet inhibiteur largement utilisé dans la littérature (Flores-Benitez et al., 2007; Moiseeva et al., 2007; Sharma et al., 2005; Nielsen et al., 2003) a été rapporté pour être très spécifique pour l'inhibition de la tyrosine kinase EGFR

Figure 30. La signalisation via l'EGFR est nécessaire pour la migration cellulaire gastrique basale ou stimulée au TGF α . **A,** Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées linéairement et lysées après 0.5, 1, 2.5 et 15 minutes. 100 μ g de lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE et les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western pour déterminer les niveaux d'expression de l'EGFR sous forme totale et phosphorylée sur la tyrosine 1068. **B,** Les cellules HGE-17 ont été blessées et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, avec ou sans 50 ng/ml de TGF α et en présence ou en absence de PD153035 (10 μ M) ou de l'anticorps neutralisant dirigé contre l'EGFR LA-1 (10 μ g/ml). Après 40 heures, le nombre de cellules ayant traversé la blessure a été compté. **C,** Les cellules HGE-17 ont été blessées linéairement, traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, avec ou sans 50 ng/ml de TGF α et avec ou sans PD153035 (10 μ M) ou l'anticorps neutralisant LA-1 (10 μ g/ml). Les cellules blessées ont été lysées après 1h, les membranes ont été enrichies par ultracentrifugation et 100 μ g de lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE. Les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western pour déterminer les niveaux d'expression de l'EGFR sous forme totale et phosphorylée tel que décrit en A. **D,** L'expression de l'ARNm des isoformes α et β du PDGR a été examinée dans les cellules épithéliales d'estomac foetal humain de 19 semaines et dans les cellules HGE-17 et HGE-20 par RT-PCR. Les cellules mésenchymateuses intestinales (HIM) et gastriques (HGM) humaines ont été utilisées comme contrôles positifs pour l'expression des isoformes α et β du PDGFR. Le S14 a été utilisé comme gène de référence.

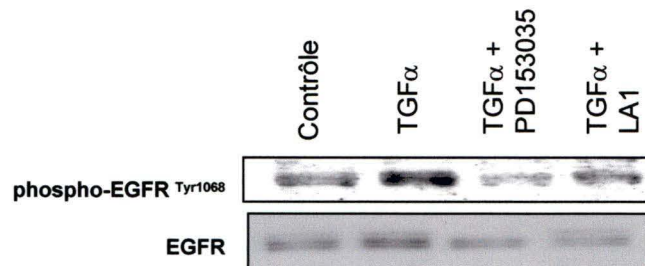
A.



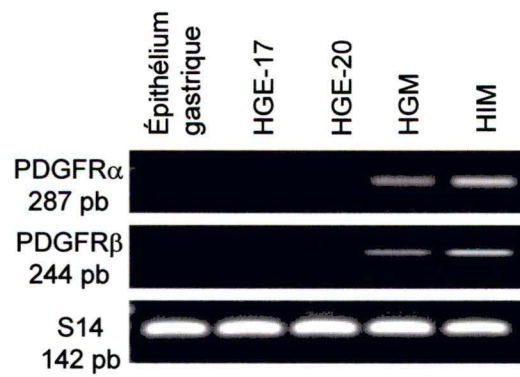
B.



C.



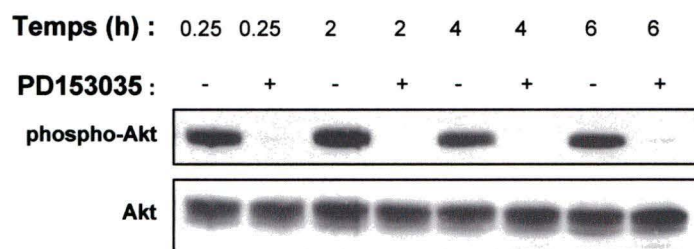
D.



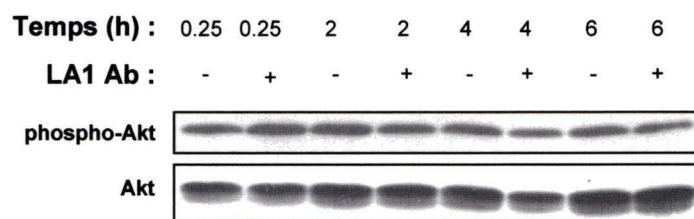
(Fig. 30C) et aussi, à un plus faible degré, à son récepteur étroitement relié HER2/neu (Bos et al. 1997). Tel que montré à la Figure 30B, l'inhibition de la kinase EGFR a aboli de façon marquée la migration cellulaire en condition basale et suivant un traitement au TGF α . En guise d'expérience supplémentaire permettant d'évaluer l'implication de l'EGFR, l'anticorps neutralisant LA-1 a aussi été utilisé dans le cadre de cette étude. Cet anticorps, qui se lie au domaine extracellulaire de la molécule EGFR et prévient la liaison de ses ligands sans toutefois altérer l'activité kinasique du récepteur, a été très bien caractérisé et fortement utilisé par plusieurs groupes de recherche (Block et al., 2004; Lambert et al., 2006; Buchanan et al., 2003; Al Mustafa et al., 1999). Tel qu'illustré à la Figure 30B, l'ajout de l'anticorps a complètement bloqué l'effet stimulateur du TGF α sur la migration cellulaire gastrique et sur la phosphorylation de l'EGFR au niveau de la Tyr¹⁰⁶⁸ (Fig. 30C). Toutefois, à notre grande surprise, le blocage de l'interaction ligand-récepteur à l'aide de l'anticorps neutralisant dirigé contre l'EGFR n'a pas altéré significativement la migration cellulaire en condition basale ou l'activation d'Akt suivant l'induction d'une blessure (Fig. 30B, 31B). De façon contraire, l'addition du PD153035 a complètement abrogé la migration basale et l'activation d'Akt observées suivant l'induction d'une blessure dans des monocouches de cellules HGE-17 (Fig. 30B, 31A). Bien que le PD153035 est connu pour être spécifique à l'EGFR (IC₅₀=14nM), il a aussi été rapporté que celui-ci pouvait inhiber le récepteur du PDGF (IC₅₀=5 μ M) (Bos et al., 1997). Afin de s'assurer de l'effet spécifique du PD153035 au niveau de l'EGFR, l'expression de l'ARNm du récepteur au PDGF (PDGFR) dans les cellules

Figure 31. La transactivation intracellulaire de l'EGFR est nécessaire pour l'activation de PI3K/Akt. A-B, Les monocouches de HGE-17 confluentes ont été blessées linéairement à maintes reprises et lysées après différents intervalles de temps en présence ou en absence de PD153035 (10 μ M) ou de l'anticorps neutralisant dirigé contre l'EGFR LA-1 (10 μ g/ml). 50 μ g de lysats cellulaires ont par la suite été séparés par SDS-PAGE et les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western pour déterminer les niveaux d'expression d'Akt sous forme totale et phosphorylée, tel que décrit à la Figure 28A.

A.



B.



épithéliales gastriques a été vérifiée par RT-PCR. Tel qu'illustré à la Figure 30D, les isoformes α et β du PDGFR ne sont pas exprimés dans les cellules HGE-17, HGE-20 et dans l'épithélium gastrique humain, contrairement aux cellules mésenchymateuses intestinales et gastriques humaines. L'ensemble de ces données suggère donc que l'activation de l'EGFR est centrale dans la régulation de ce processus responsable de l'induction du mouvement cellulaire épithélial gastrique suivant le relâchement de contraintes spatiales, à la fois en absence ou en présence des ligands exogènes EGF/TGF α .

2.3 Rôle de pp60c-src dans la transactivation de l'EGFR et dans la restitution épithéliale gastrique

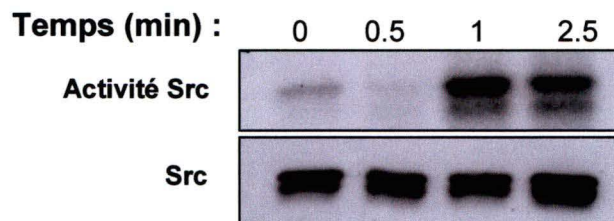
L'observation que l'anticorps LA-1 a bloqué les effets du TGF α exogène sans toutefois altérer à la fois la phosphorylation de l'EGFR (Fig. 30C), l'activation d'Akt ou encore le nombre de cellules ayant traversé la marge de la blessure dans les conditions basales, nous indique que la transactivation de l'EGFR survient par un mécanisme intracellulaire plutôt que via la liaison extracellulaire d'un ligand (Buchanan et al., 2003; Pai et al., 2002). Plusieurs études effectuées sur de lignées cellulaires ont rapporté que l'activation de pp60c-src est impliquée dans la transactivation de l'EGFR via les récepteurs couplés aux protéines G et les intégrines (Buchanan et al., 2003; Moro et al., 2002; Waters et al., 2004). Par conséquent, l'activité pp60c-src a été établie en effectuant un essai kinasique d'autophosphorylation *in vitro* à différents intervalles de temps après l'induction d'une blessure épithéliale en conditions basales. L'activité de pp60c-src a été

analysée dans les essais kinasiques d'autophosphorylation à l'aide d'un anticorps spécifique à ce membre de la famille Src. Tel que démontré à la Figure 32A, le plus fort signal d'autophosphorylation de l'activité pp60c-src immunoprécipitée a été observé après 1 minute suivant la blessure des cellules HGE-17 confluentes. Nous avons par la suite vérifié comment l'activité pp60c-src est requise pour la migration cellulaire gastrique et l'activation d'Akt. Tel qu'illustré à la Figure 32 (B et C), les pré-traitements avec le PP2, un inhibiteur des différents membres de la famille de tyrosines kinases Src (Hanke et al., 1996; Keely et Parise, 1996), a complètement empêché la migration cellulaire et l'activation d'Akt induites par une blessure en conditions basales. Un traitement au PP2 a également fortement inhibé la restitution épithéliale suite à un traitement au TGF α (Fig. 32B). Dans le but de déterminer si l'activation de Src suivant une blessure survient en amont ou en aval de l'EGFR, l'effet du PP2 sur la phosphorylation de l'EGFR au niveau de la tyrosine 1068 a été examiné. Le pré-traitement des cellules HGE-17 avec le composé PP2 a complètement prévenu l'activation de l'EGFR induite suivant une blessure épithéliale (Fig. 32D). Ces résultats indiquent ainsi que l'induction d'une blessure épithéliale dans des conditions réduites en sérum transactive l'EGFR des cellules gastriques de manière pp60c-src-dépendante et que cette activation de pp60c-src survient en amont de l'EGFR.

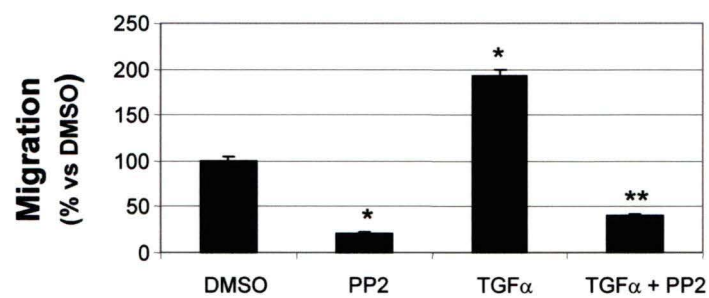
2.4 Rôle des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des intégrines dans la restitution épithéliale gastrique

Figure 32. Rôle de pp60c-Src dans la transactivation de l'EGFR et dans la restitution épithéliale gastrique. **A**, Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées linéairement à maintes reprises et lysées après 0.5, 1 et 2.5 minutes. Les cellules ont par la suite été lysées et 800 µg des lysats ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé spécifiquement contre pp60c-src. Les niveaux de pp60c-src immunoprécipités ont été analysés par immunobuvardage de type Western et l'activité kinase a été démontrée par autophosphorylation de la kinase suivie d'une autoradiographie. **B**, Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées et incubées en présence de 20 mM d'hydroxyurée, en absence (DMSO) ou en présence de TGF α , ou en absence ou en présence de PP2 (5 µM). Après 40h, la restitution épithéliale a été déterminée en tant que le pourcentage de variation du nombre de cellules ayant traversé la blessure en comparaison aux contrôles. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences. Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles (DMSO), *P<0.05. **C-D**, Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées de manière linéaire à plusieurs reprises, puis traitées avec de l'hydroxyurée (20 mM), en présence ou en absence de PP2 (5 µM). 100 µg de lysats cellulaires ont par la suite été séparés par SDS-PAGE et les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western pour déterminer les niveaux d'expression de l'EGFR sous forme totale et phosphorylée en (**D**) et d'Akt en (**C**).

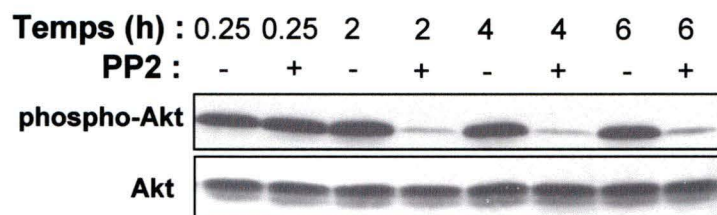
A.



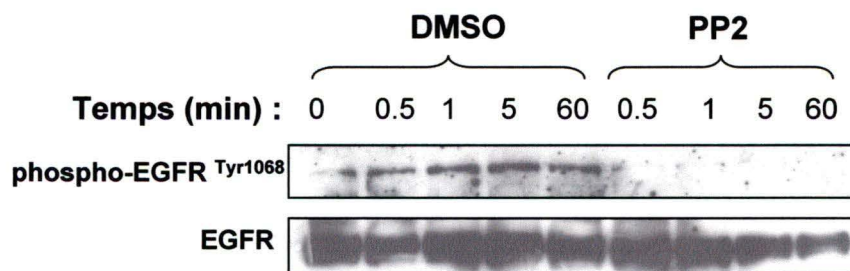
B.



C.

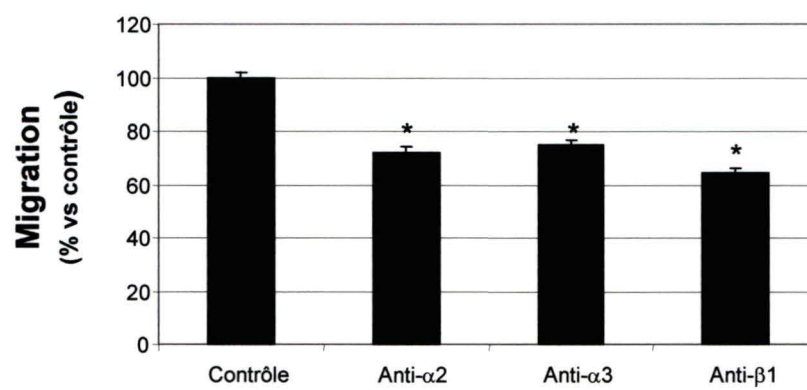


D.



Il est possible que l'événement initiateur de l'induction de la migration du feuillet épithélial gastrique dans notre système soit l'interaction des récepteurs de la surface cellulaire avec les éléments de la matrice extracellulaire. Les intégrines sont des candidats potentiels en tant que récepteurs pouvant interagir avec la matrice extracellulaire. De plus, l'activation du récepteur de l'EGF médiée par les intégrines a été rapportée pour survenir par un mécanisme intracellulaire n'impliquant pas la production de ligands extracellulaires (Moro et al., 2002). Notre récente observation que l'expression de l'intégrine $\alpha2\beta1$ est importante dans le maintien et/ou la différenciation des cellules principales gastriques humaines (Basque et al., 2002) nous a incité à vérifier l'implication potentielle de cette intégrine dans la restitution épithéliale gastrique. Ainsi, nous avons effectué des essais de neutralisation des sous-unités $\alpha2$ et $\beta1$ des intégrines dans des monocouches de cellules HGE-17 blessées. Tel qu'illustré à la Figure 33, l'addition d'un anticorps neutralisant (10 $\mu\text{g/ml}$) dirigé contre la sous-unité $\alpha2$ ou contre la sous-unité $\beta1$ (10 $\mu\text{g/ml}$) des intégrines a inhibé significativement la migration cellulaire induite par une blessure. L'implication potentielle de la sous-unité $\alpha3$ des intégrines, qui a été démontrée pour se lier à la laminine-5 (Teller et Beaulieu, 2001) et pour réguler la migration cellulaire intestinale et des kératinocytes (Chroma et al., 2004; Frank et Carter, 2004), a également été évaluée. Tel que démontré à la Figure 33, l'addition d'un anticorps neutralisant (10 $\mu\text{g/ml}$) dirigé contre la sous-unité $\alpha3$ des intégrines a diminué significativement le nombre de cellules ayant traversé la blessure. Par conséquent, l'utilisation des anticorps neutralisants a démontré l'importance des

Figure 33. Rôle des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 1$ des intégrines dans la restitution épithéliale gastrique. Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées, incubées dans du FBS 0,1%, en présence de 20 mM d'hydroxyurée et incubées en absence ou en présence d'anticorps neutralisants dirigés contre les sous-unités $\alpha 2$ (5 $\mu\text{g/ml}$), $\alpha 3$ (5 $\mu\text{g/ml}$) et $\beta 1$ (10 $\mu\text{g/ml}$). Après 40 heures, le nombre de cellules ayant traversé la blessure a été compté.



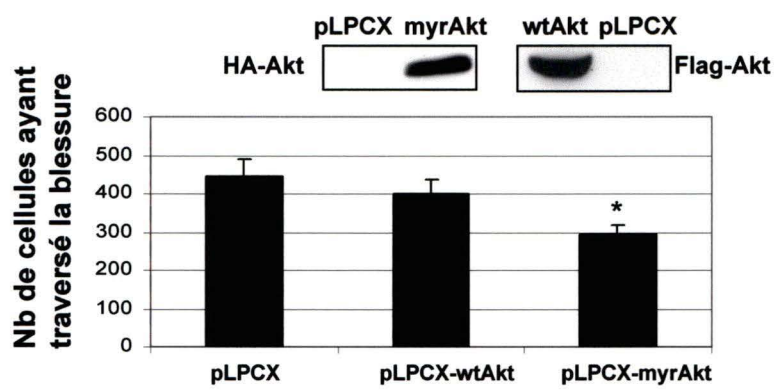
intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ dans la restitution des cellules épithéliales gastriques humaines.

2.5 L'activation des effecteurs en aval de la PI3K Akt, p70S6K et ILK module la migration cellulaire gastrique induite par une blessure

Le PtdIns(3,4,5)P₃ est un des produits lipidiques de la PI3K agissant comme site d'ancrage pour un sous-groupe de protéines possédant un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) (Downes et al., 2005; Wymann et Marone, 2005). Parmi ces protéines, on retrouve PDK1 (phosphoinositide dependent-kinase 1), une kinase qui régule l'activation d'Akt et d'ILK (integrin-linked kinase). À son tour, Akt contrôle plusieurs enzymes critiques pour la division cellulaire et la survie, incluant mTOR (mamalian target of rapamycin), qui active à son tour la p70S6K (p70 ribosomal S6 kinase). Ces deux enzymes sont reconnues pour réguler entre autres la synthèse protéique (Kozma et Thomas, 2002). Dans le but de déterminer comment l'activation d'Akt contribue à la restitution de monocouches de cellules HGE-17 blessées, une population de cellules HGE-17 exprimant de manière stable un variant myristylé d'Akt (myrAkt) a été établie par la transduction d'un vecteur rétroviral dans les cellules. Akt sous forme myristylée est localisé à la membrane indépendamment de la voie PI3K et est constitutivement actif (Li et al., 2000). De façon parallèle, une population de cellules HGE-17 exprimant une forme d'Akt de type sauvage non myristylée (wtAkt) a aussi été établie. Tel qu'illustré à la Figure 34, les deux différents variants d'Akt sont exprimés fortement dans les cellules HGE-17. Des

Figure 34. Rôle de la kinase Akt dans la restitution épithéliale gastrique.

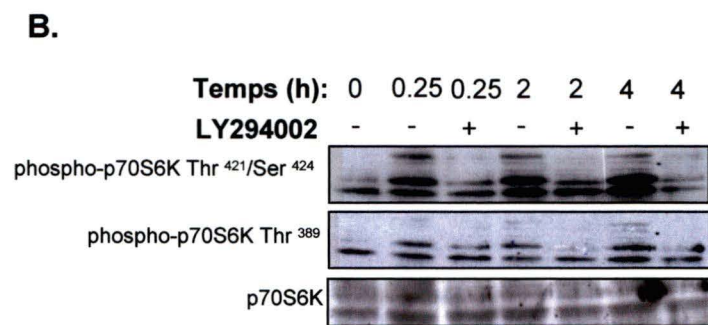
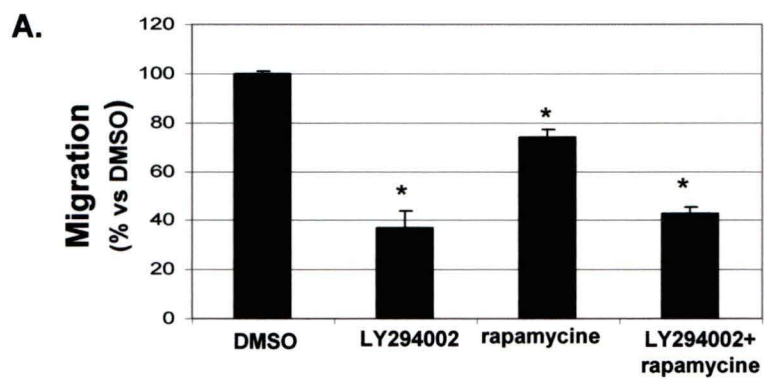
Des populations de cellules HGE-17 surexprimant de manière stable un vecteur vide (pLPCX), Akt de type sauvage (wtAkt) et Akt sous forme myristylée (myrAkt) ont été générées suite à une infection rétrovirale et à un processus de sélection. Les monocouches de chaque population cellulaire ont été blessées en présence de 20 mM d'hydroxyurée. Après 40 heures, le nombre de cellules ayant traversé la blessure a été compté. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences. Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles (pLPCX), * $P < 0.05$.



monocouches confluentes de chacune des populations cellulaires ont été subséquemment blessées et les cinétiques de migration ont été analysées. Tel que démontré à la Figure 34, ni la surexpression de wtAkt ou de myrAkt n'a accéléré la migration cellulaire en comparaison à la surexpression du vecteur rétroviral vide, indiquant qu'Akt ne stimule pas la migration des cellules épithéliales gastriques humaines.

Dans le but de déterminer comment l'activation de la voie mTOR/p70S6K est impliquée dans la régulation de la migration cellulaire gastrique humaine, les cellules confluentes ont été incubées en présence de rapamycine (inhibiteur de mTOR) et ses effets ont été analysés sur la migration cellulaire suivant l'induction d'une blessure en condition basale. Tel qu'illustré à la Figure 35A, un pré-traitement des cellules HGE-17 avec la rapamycine a inhibé significativement la migration cellulaire induite par une blessure de 28%, suggérant ainsi l'implication de la voie mTOR/p70S6K dans la restitution épithéliale gastrique humaine. Dans le but d'établir si la PI3K et mTOR/p70S6K agissent sur une voie commune ou via des voies parallèles, l'effet du LY294002 a été évalué dans des cellules dans lesquelles la voie mTOR/p70S6K était également inhibée. Tel qu'illustré à la Figure 35A, la combinaison du LY294002 avec la rapamycine a diminué davantage le nombre de cellules ayant traversé la blessure et ce, à un niveau comparable à celui observé en présence du LY294002 seulement. De plus, les niveaux de phosphorylation des résidus Thr³⁸⁹ et Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴ de la p70S6K déterminés jusqu'à 4 heures suivant l'induction d'une blessure ont

Figure 35. Rôle de la kinase p70S6K dans la restitution épithéliale gastrique. **A,** Les cellules HGE-17 nouvellement confluentes ont été blessées et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, sans (DMSO) ou avec 25 nM de rapamycine, 5 μ M de LY294002 ou 25 nM de rapamycine + 5 μ M de LY294002. La restitution a été déterminée après 40h en tant que le pourcentage de variation du nombre de cellules ayant traversé la blessure en comparaison aux contrôles. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences. Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles (DMSO), * $P < 0.05$. **B,** Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées linéairement à maintes reprises et lysées à différents intervalles de temps avec ou sans 5 μ M de LY294002. 50 μ g de lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE et les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type Western dans le but de déterminer les niveaux d'expression et de phosphorylation de la p70S6K. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences.



été inhibés en présence du LY294002, supportant davantage l'observation que la p70S6K est dépendante de l'activité de la PI3K (Fig. 35B).

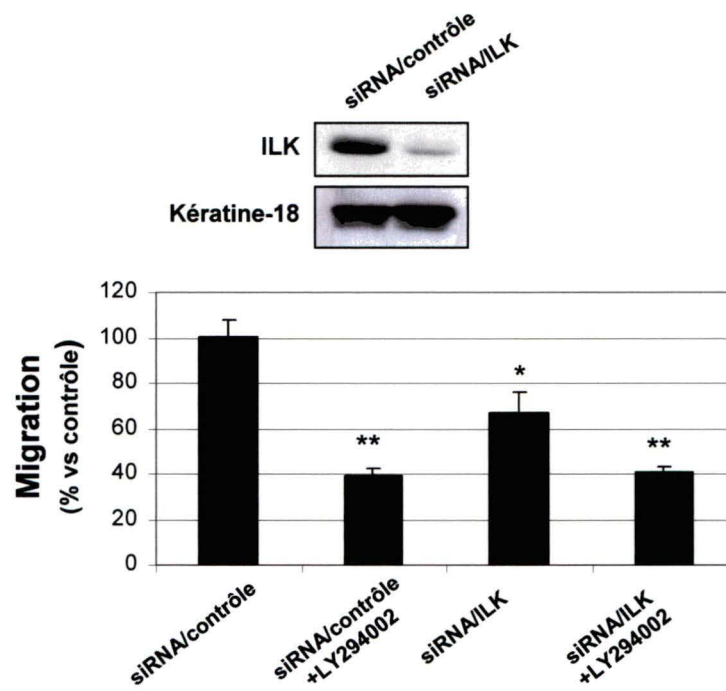
Finalement, le rôle potentiel de l'ILK sur la restitution épithéliale gastrique a aussi été investigué. Pour ce faire un siRNA synthétique commercial a été transfecté dans les cellules HGE-17, de façon à pouvoir inhiber la synthèse protéique d'ILK. Un siRNA synthétique commercial a également été utilisé comme contrôle. Tel que montré à la Figure 36A, les cellules transfectées avec un siRNA ciblant ILK présentent une forte réduction de la synthèse protéique d'ILK, à l'opposition des cellules transfectées avec un siRNA contrôle. La quantification de trois expériences indépendantes a indiqué que l'expression d'ILK est réduite par 84% dans les cellules transfectées avec le siRNA dirigé contre ILK. Ce siRNA a subséquemment été utilisé pour déterminer de quelle manière une expression réduite d'ILK peut affecter la migration des cellules HGE-17. Les monocouches confluentes de cellules HGE-17 transfectées avec le siRNA dirigé contre ILK ont été blessées et le nombre de cellules ayant traversé la blessure a été déterminé après 24 heures. Tel qu'illustré à la Figure 36A, la diminution de l'expression d'ILK a diminué la migration cellulaire induite par une blessure de 33%, en comparaison aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle. L'addition du LY294002 aux cellules HGE-17 exprimant un siRNA dirigé contre ILK a inhibé le nombre de cellules ayant traversé la blessure à un niveau comparable à celui observé en présence du LY294002 seulement. De plus, l'induction de l'activité kinase d'ILK observée jusqu'à 4 heures suivant l'induction d'une blessure a été

Figure 36. Rôle de la kinase ILK dans la restitution épithéliale gastrique. A,

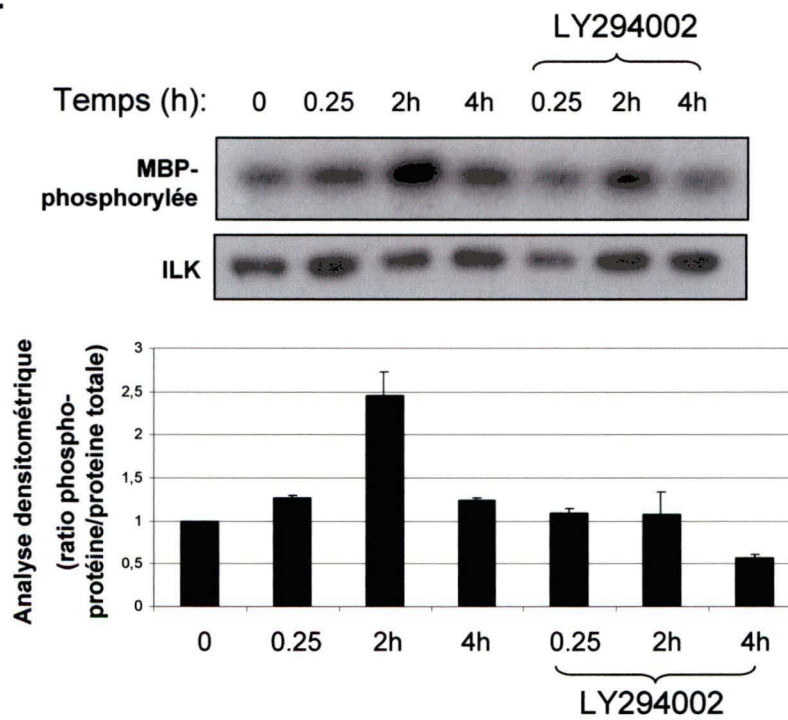
Les cellules ont été nucléofectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre ILK. Cinq jours suivant la nucléofection, un premier groupe de cellules confluentes a été lysé. Par la suite, les lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE et les protéines analysées par immunobuvardage de type Western pour déterminer les niveaux d'expression d'ILK et de la kératine-18. Un second groupe de cellules confluentes a été blessé et traité avec 20 mM d'hydroxyurée, en absence ou en présence de 5 μ M de LY294002. Après 40h, la restitution épithéliale a été déterminée en tant que le pourcentage de variation du nombre de cellules ayant traversé la blessure en comparaison aux contrôles.

B, Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées linéairement à maintes reprises et lysées à différents intervalles de temps avec ou sans 5 μ M de LY294002. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps spécifique à l'ILK et l'activité kinase a été démontrée par la phosphorylation de la MBP (myelin basic protein). Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences. Les astérisques indiquent une différence significative en comparaison aux contrôles (siRNA/contrôle), * $P < 0.05$, ou pour le siRNA/ILK, ** $P < 0.05$.

A.



B.



significativement inhibée en présence du LY294002 (Fig. 36B), supportant encore plus l'observation que l'activation d'ILK est dépendante de l'activité de la PI3K.

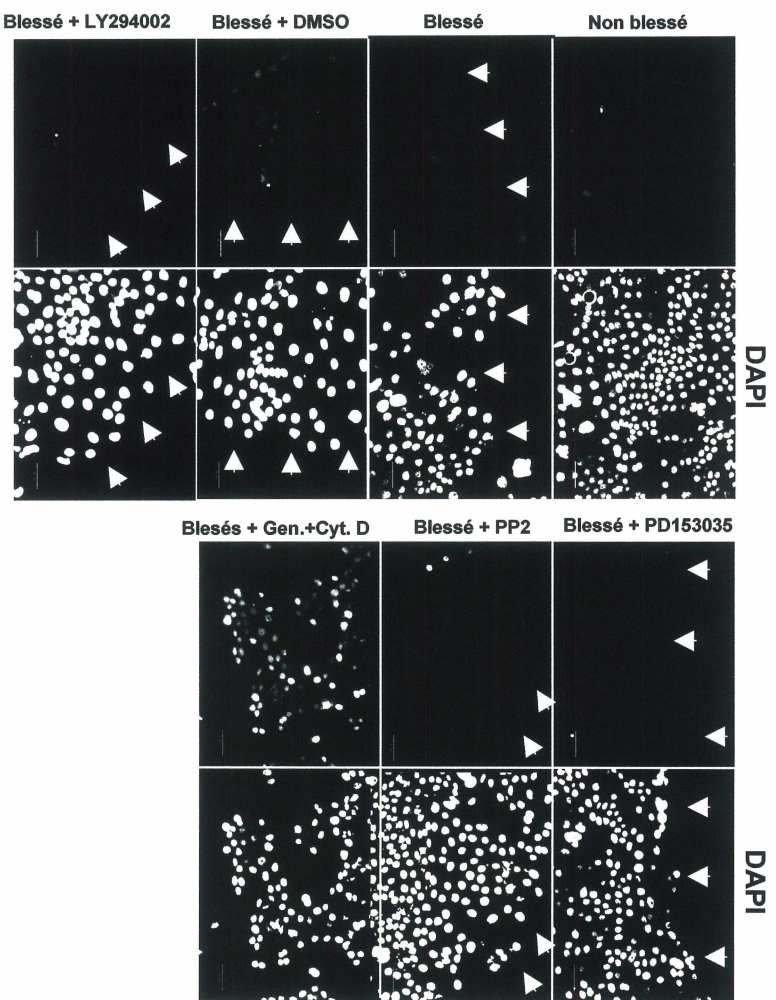
2.6 Impact des inhibiteurs pharmacologiques sur la viabilité cellulaire

Bien qu'aucune fragmentation nucléaire ou encore qu'aucun détachement cellulaire n'aient été observés suivant l'utilisation de tous les inhibiteurs pharmacologiques spécifiques servant à l'identification des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la migration cellulaire gastrique (résultats non montrés), deux méthodes quantifiant le degré d'apoptose soit l'essai TUNEL et la mesure de l'activité de la caspase-3 ont été utilisées dans le cadre de cette étude afin d'éliminer tout doute possible quant aux effets spécifiques des inhibiteurs sur les voies de signalisation étudiées. Tel qu'il est clairement illustré à la Figure 37 (A et B), les niveaux d'apoptose retrouvés sont faibles et comparables, que ce soit dans les cellules incubées en présence ou en absence des inhibiteurs pharmacologiques. Par conséquent, ces observations excluent une interférence potentielle de la mort cellulaire avec les voies de signalisation intracellulaires identifiées suivant l'induction d'une blessure épithéliale gastrique humaine.

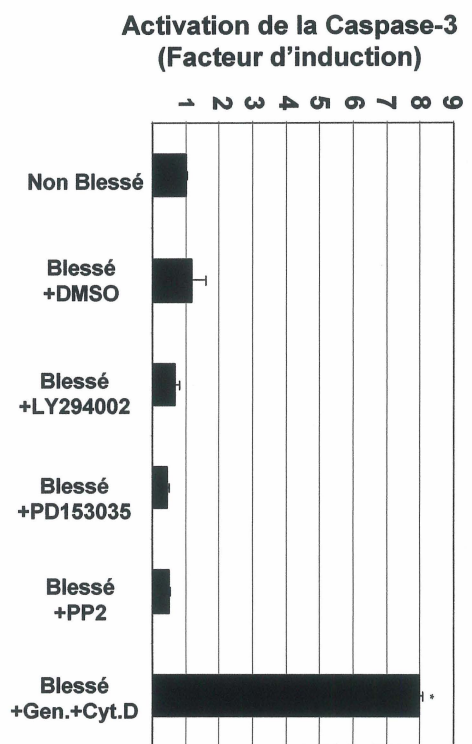
3. L'EGFR, la PI3K et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ sont requis pour l'étalement des feuillets épithéliaux au cours de la restitution épithéliale gastrique

Figure 37. Analyse de la viabilité des cellules HGE-17 en présence de DMSO, LY294002, PP2, PD153035, génistéine et cytochalasine D. **A,** Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, en présence ou en absence de DMSO (0,1%) ou de LY294002 (5 μ M) ou de PP2 (5 μ M) ou de PD153035 (10 μ M) ou de cytochalasine D (1 μ M) + génistéine (200 μ M). Les flèches indiquent le site de la blessure. Après 40 heures, les cellules ont été fixées avec de la formaldéhyde et perméabilisées avec 0,1% de Triton avant de procéder aux marquages ISEL servant à la détection des noyaux apoptotiques. Les images représentatives de fluorescence sont montrées. Barres, 50 μ m. **B,** Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, en présence ou en absence de DMSO (0,1%) ou de LY294002 (5 μ M) ou de PP2 (5 μ M) ou de PD153035 (10 μ M) ou de cytochalasine D (1 μ M) + génistéine (200 μ M). Les cellules ont été lysées et l'activité protéase de la caspase-3 a été effectuée par un dosage spectrofluorométrique tel que décrit dans la section matériel et méthodes. Les variations de l'activité de la caspase-3 ont été estimées relatives à l'activité du contrôle (sans blessure) après 40h.

A.



B.



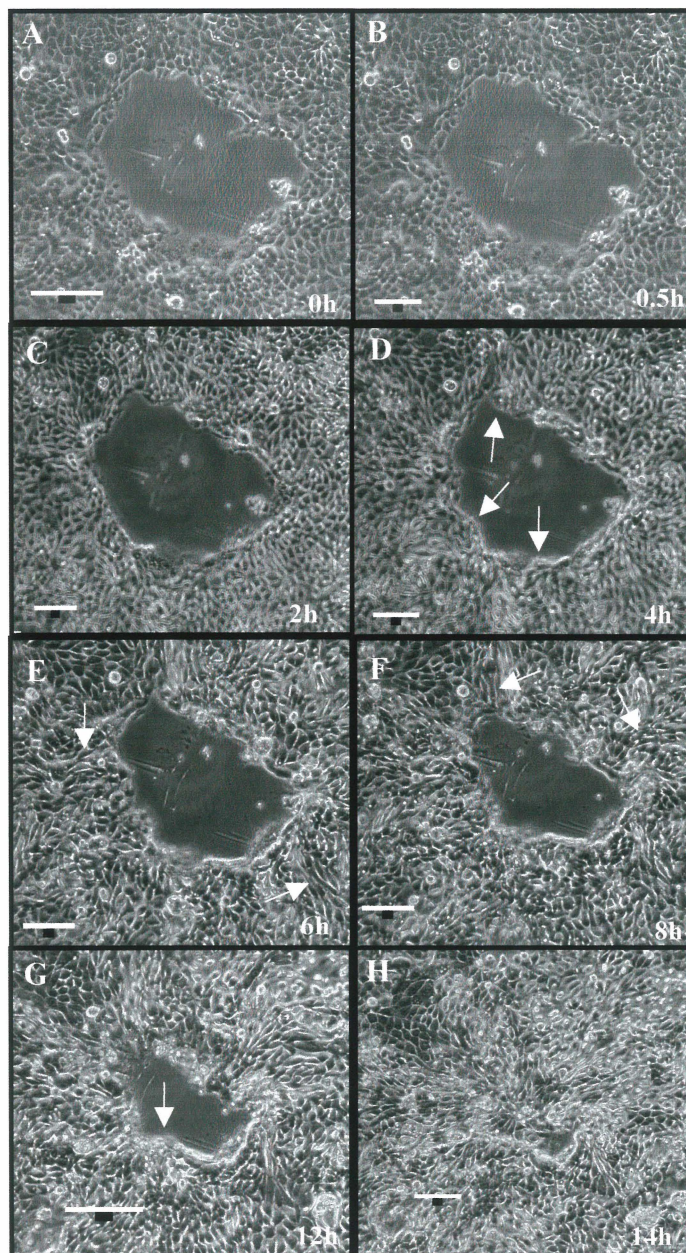
Jusqu'à présent, le modèle de microblessure nous a permis l'identification et la caractérisation des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la modulation de la restitution épithéliale gastrique, un processus combinant l'étalement et la migration cellulaire. Les données concernant la caractérisation des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans le contrôle spécifique de l'étalement cellulaire sont très limitées. Jusqu'à maintenant, quelques études effectuées sur des monocouches de cellules épithéliales intestinales (Florian et al., 2002; Russo et al., 2005; Lotz et al., 2000) ou sur des épidermes embryonnaires (Martin et Lewis, 1992) ont rapporté qu'il était possible de différencier l'étalement de la migration cellulaire en utilisant une méthode de micro-blessure *in vitro*. Comme jusqu'à ce jour il n'existe aucune donnée concernant l'étalement des cellules épithéliales gastriques, nous avons entrepris d'adapter ce modèle de micro-blessure au niveau des cellules HGE-17 dans le but de discriminer les facteurs de croissance et les voies de signalisation qui sont spécifiquement impliqués dans le processus d'étalement versus la migration.

3.1 Dynamique d'étalement cellulaire

Dans un premier temps, la validité du modèle de blessure par aspiration au niveau des feuillets épithéliaux gastriques humains a été évaluée en effectuant une micro-blessure au niveau des cellules HGE-17 par aspiration d'une monocouche cohérente à l'aide d'une aiguille préalablement fixée à l'extrémité d'une seringue, suivie d'une incubation en présence de 20 mM d'hydroxyurée. Avant de se lancer dans une vaste série d'expériences, la mesure de la surface

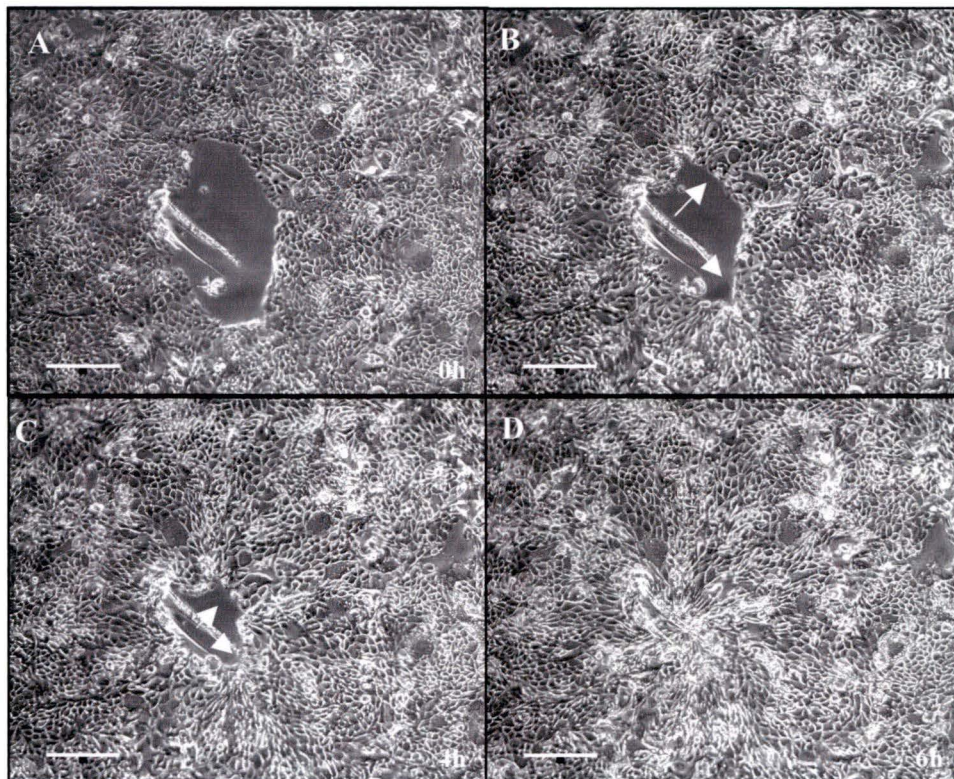
maximale de la zone dénudée requise pour induire uniquement l'étalement cellulaire suivant une blessure a été déterminée par l'analyse de la présence de structures migratoires à la marge de la blessure en utilisant un marquage de l'actine-F à l'aide de la phalloïdine-FITC. Ainsi, le diamètre initial maximal requis pour induire uniquement de l'étalement dans les monocouches de cellules HGE-17 s'est situé à 300 μm (résultat non montré). C'est pourquoi le diamètre initial des micro-blessures examinées dans le cadre de cette étude a été établi à 75-100 μm . Dans un deuxième temps, la capacité d'étalement des feuillets épithéliaux gastriques humains suite à l'induction d'une micro-blessure a été évaluée en condition basale (FBS 0,1%). Des images de la progression de la fermeture de la blessure ont été prises à des intervalles réguliers de deux heures jusqu'à la fermeture complète de la micro-blessure. Le diamètre des blessures aux différents intervalles de temps a été mesuré et ces valeurs ont été comparées avec la mesure du diamètre initial et c'est ainsi que le pourcentage de fermeture de la micro-blessure a été déterminé pour chaque intervalle de temps. La Figure 38 illustre la réponse des cellules HGE-17 nouvellement confluentes suivant l'induction d'une micro-blessure dans des conditions réduites en sérum (conditions basales). En absence de facteurs de croissance exogènes, le temps de fermeture moyen des blessures s'est situé à environ 14 heures (Fig. 38H et Fig. 41). La séquence des événements impliqués dans la fermeture des blessures en condition basale a été par la suite analysée. Tout d'abord, après 4 heures suivant l'induction de la blessure, un anneau de

Figure 38. Séquences d'événements survenant durant la fermeture des blessures des monocouches de cellules HGE-17. Les cellules HGE-17 nouvellement confluentes ont été blessées par aspiration à l'aide d'une aiguille, puis traitées avec 20 mM d'hydroxyurée. Le processus de fermeture de la blessure a été examiné par microscopie vidéo en temps réel. Le temps indiqué dans chacun des panneaux réfère au nombre d'heures écoulées depuis l'induction de la blessure. **(A)** La première image a été prise immédiatement suivant l'induction de la micro-blessure. **(B)** À 30 minutes, une légère rétraction de la marge de la blessure peut être observée. **(C)** Après 2 heures, la rétraction cesse et une réduction significative du diamètre de la zone dénudée de la blessure est observée. **(D)** 4 heures suivant l'induction de la blessure, un anneau réfractile entourant la blessure est évident (flèches blanches). **(E-G)** Suivant l'apparition de l'anneau réfractile, les cellules bordant la blessure commencent à s'allonger et leur surface augmente de deux fois (flèches blanches). Au moment où l'anneau réfractile devient moins évident, la formation de protrusions telles que des lamelles sont observées à la surface des cellules de la marge de la blessure (flèche blanche). **(H)** Après 14 heures, la blessure est complètement refermée. Barres, 50 μ M.



contraction localisé à la marge de blessure a été observé (Fig. 38D, voir flèches). 6 heures suivant l'induction de la blessure, des protrusions lamellaires ont commencées à être observées dans les cellules bordant la blessure, pour par la suite graduellement venir recouvrir entièrement la surface de la blessure en restitution. De façon approximative, au même moment, les cellules bordant la blessure ont commencé à s'allonger et à augmenter significativement leur diamètre d'une proportion d'environ 2 fois. En se basant sur ces observations initiales, il apparaît évident que suivant l'induction des micro-blessures une force d'attraction est exercée sur les cellules bordant la blessure, les induisant ainsi à s'aplatir. De plus, cette force d'attraction semble être initiée principalement par la formation d'un anneau de contraction et par la formation de lamelles cytoplasmiques à la marge de la blessure en étalement. Par la suite, la microscopie électronique à balayage a été utilisée dans le but de détailler l'ultrastructure des monocouches de cellules HGE-17 endommagées par une micro-blessure (Fig. 40, A et B). En accord avec les observations de microscopie vidéo en temps réel, les analyses de la microscopie électronique à balayage ont révélé la persistance des contacts cellule-cellule et l'aplatissement des cellules bordant la blessure, confirmant ainsi que la fermeture des micro-blessures survient bel et bien uniquement par étalement cellulaire. De plus, la présence d'un anneau de contraction et la formation de lamelles ont été observées à la marge de la blessure. Toutefois, il est important de mentionner qu'aucune lamellipode n'a été observée durant le processus de fermeture de micro-blessure en entier, que ce soit en absence (Fig. 40A) ou en présence (Fig.

Figure 39. Séquences d'événements survenant durant la fermeture des blessures des monocouches de cellules HGE-17 en présence de $TGF\alpha$. Les cellules HGE-17 nouvellement confluentes ont été blessées par aspiration à l'aide d'une aiguille, puis traitées avec 20 mM d'hydroxyurée. Le processus de fermeture de la blessure a été examiné par microscopie vidéo en temps réel. Le temps indiqué dans chacun des panneaux réfère au nombre d'heures écoulées depuis l'induction de la blessure. **(A)** La première image a été prise immédiatement suivant l'induction de la micro-blessure. **(B)** 2 heures suivant l'induction de la blessure, un anneau réfractile entourant la blessure est évident (flèches blanches). **(C)** Au moment où l'anneau réfractile devient moins évident, la formation de protrusions telles que des lamelles sont observées à la surface des cellules de la marge de la blessure (flèche blanche). **(D)** Après 6 heures, la blessure est complètement refermée. Barres, 50 μ M.

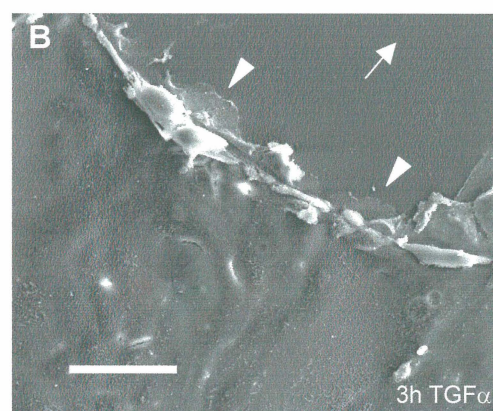
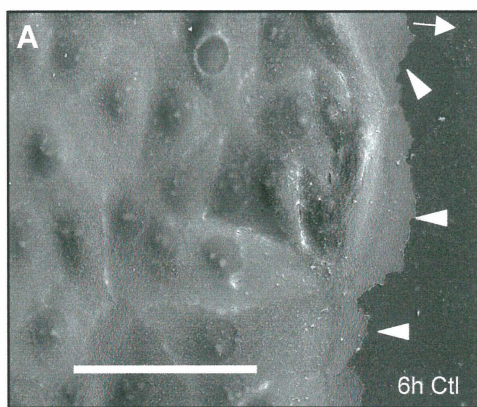


40B) du facteur de croissance $TGF\alpha$. L'ensemble de ces données confirme donc que le modèle de micro-blessure induit uniquement l'étalement cellulaire dans les cellules épithéliales gastriques humaines. Par conséquent, ce modèle de micro-blessure est valide pour étudier les modulateurs et les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'étalement cellulaire dans le contexte d'un épithélium blessé et non de cellules isolées.

3.2 Les facteurs de croissance exogènes EGF et $TGF\alpha$ sont des inducteurs majeurs de l'étalement cellulaire épithélial gastrique

Les effets de différents facteurs de croissance exogènes sur la capacité d'étalement de l'épithélium gastrique humain ont été évalués. Tel qu'illustré à la Figure 41, les facteurs de croissance exogènes $TGF\alpha$ et EGF ont été capables d'accélérer la réponse d'étalement de monocouches de cellules HGE-17 blessées. Par exemple, le $TGF\alpha$ et l'EGF, à une concentration de 5 ng/ml, ont diminué de façon marquée (7h vs 14h) le temps de fermeture de la blessure en comparaison aux conditions contrôles. Le HGF, à des concentrations de 20 ng/ml, a également accéléré la progression de la fermeture de la blessure et s'est avéré être 50% moins efficace en ce qui a trait à la surface recouverte par les cellules en étalement en comparaison aux facteurs de croissance EGF/ $TGF\alpha$. De façon contraire, l'ajout du facteur de croissance exogène IGF-I n'a exercé aucun effet significatif sur l'étalement des monocouches de cellules HGE-17 suite à une micro-blessure. Les analyses de microscopie vidéo en temps réel ont révélé également que la fermeture des blessures stimulées au

Figure 40. Évaluation de la morphologie cellulaire durant l'étalement des monocouches de cellules HGE blessées. Des observations ultrastructurales des monocouches de cellules HGE-17 ont été réalisées par microscopie électronique à balayage, après 6 heures (basal) **(A)** et 3 heures ($\text{TGF}\alpha$) **(B)** suivant l'induction de la blessure. **(A)** 6 heures suivant l'induction d'une blessure en condition contrôle, des lamelles sont observées à la surface de la majorité des cellules bordant la blessure (têtes de flèches). **(B)** La présence de $\text{TGF}\alpha$ (5 ng/ml) induit de l'étalement cytoplasmique intense (non montré). Après 3 heures, des protrusions lamellaires sont observées à la surface des cellules bordant la blessure à l'endroit où l'anneau réfractile devient de moins en moins évident (têtes de flèches). Aucun lamellipode n'a été observé durant le processus entier de réparation. Les flèches blanches indiquent la direction de la fermeture de la blessure survenant par étalement cellulaire au niveau de chaque image. Barres, 50 μM .

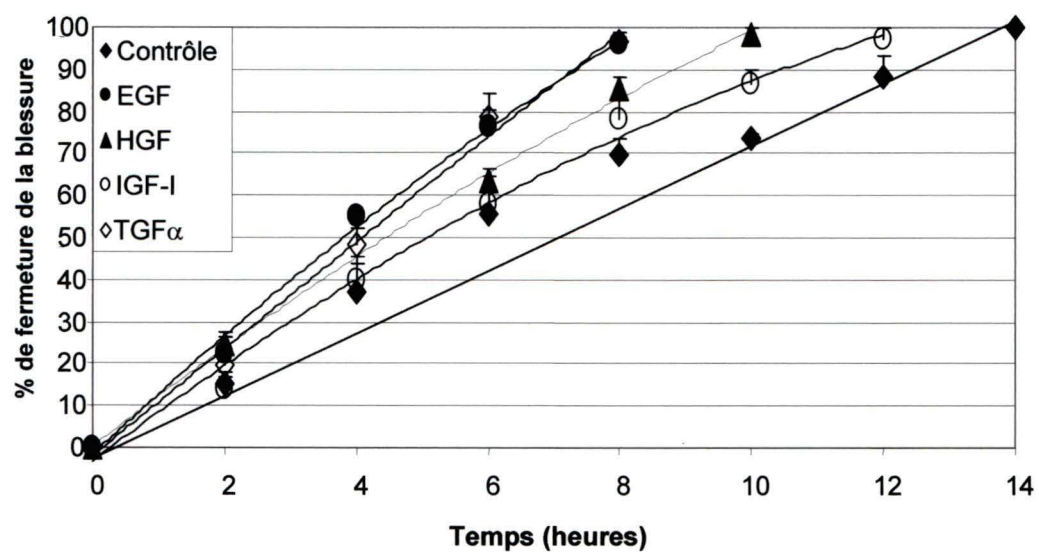


TGF α implique les mêmes événements morphologiques que ceux observés dans les conditions basales (formation d'un anneau de contraction, élongation cellulaire et protrusions lamellaires), à l'exception que ces phénomènes surviennent beaucoup plus rapidement. En effet, après 2 heures, les blessures stimulées au TGF α exhibent déjà un anneau de contraction et par la suite, les cellules de la marge de la blessure produisent graduellement des protrusions lamellaires. Finalement, après 4 heures, la blessure est entièrement recouverte par des lamelles (Fig. 39, voir flèches blanches).

3.3 Les micro-blessures induites dans des monocouches de cellules HGE-17 se referment grâce à la formation d'un anneau de contraction d'actine et par la formation de protrusions lamellaires

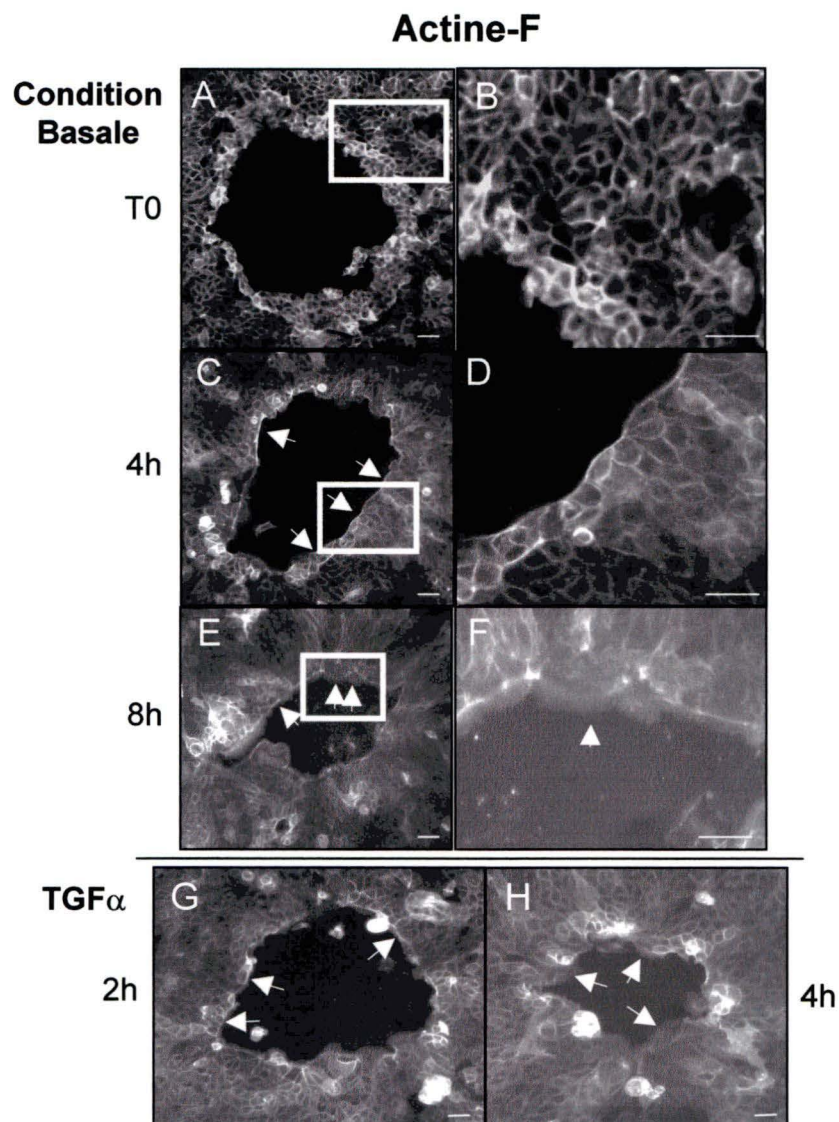
L'analyse de la morphologie des cellules HGE-17 blessées suggère fortement que l'anneau de contraction observé durant la fermeture d'une micro-blessure, en présence ou en absence de TGF α exogène, est un anneau de contraction d'actine similaire à ce qui a été observé antérieurement au niveau de d'autres modèles cellulaires (Lotz et al. 2000; Martin et Lewis, 1992; Bement et al., 1993). Ces observations suggèrent également l'importance des réarrangements du cytosquelette dans le processus de fermeture de blessure accompli uniquement par un processus d'étalement cellulaire du feuillet épithélial. Par conséquent, une étude plus poussée de l'anneau de contraction d'actine et des lamelles à l'aide de la phalloïdine-FITC servant à marquer l'actine-F a été effectuée à différents intervalles de temps suivant une blessure (Fig. 42, A-H).

Figure 41. Progression de la fermeture de la blessure dans les monocouches de cellules HGE-17 en présence de FBS 0,1 % et de TGF α , EGF, HGF, IGF-I. La fermeture de la blessure a été déterminée par la surface recouverte par les cellules en étalement (en %) en fonction du temps (en heures) en présence ou en absence de facteurs de croissance. Contrôle (0,1% FBS); EGF (5 ng/ml); TGF α (5 ng/ml); HGF (20 ng/ml); IGF-I (100 ng/ml). Ces résultats sont représentatifs de cinq différentes expériences.



Immédiatement suivant l'induction d'une blessure, les filaments d'actine sont principalement concentrés à la périphérie des cellules (Fig. 42, A et B). Après 4 heures, les cellules bordantes possèdent une ceinture continue d'actine entourant toute la circonférence de la blessure (voir flèches), alors que l'actine-F des cellules de la monocouche adjacente à la blessure reste localisée à la périphérie de celles-ci (Fig. 42, C et D). Après huit heures, la blessure est complètement recouverte par les lamelles (Fig. 42, E et F, voir flèches). À noter que le marquage des monocouches blessées avec la phalloïdine-FITC a également permis de démontrer la présence d'actine-F à l'intérieur des lamelles formées à la marge de la blessure (Fig. 42, F et H). Une distribution similaire de l'actine-F a été observée dans les monocouches de cellules HGE-17 blessées en présence de $TGF\alpha$, à l'exception que ces réarrangements du cytosquelette surviennent beaucoup plus rapidement que dans les conditions basales. Par exemple, l'anneau de contraction d'actine-F a été observé après seulement 2 heures suivant l'induction de la blessure, alors que la formation de lamelles a quant à elle été activée après 4 heures (Fig. 42, G-H). Dans le but de compléter les analyses de la localisation de l'actine-F, la distribution de la tubuline- α , une composante des microtubules, a été examinée durant le processus de fermeture des micro-blessures. Pour ce faire, un marquage de la tubuline- α a été effectué sur de monocouches de cellules HGE-17 blessées à différents intervalles de temps. La Figure 43 (A et B) montre la présence de la polymérisation des microtubules au niveau seulement des lamelles cytoplasmiques des cellules localisées à la marge de la blessure et ce, après 8

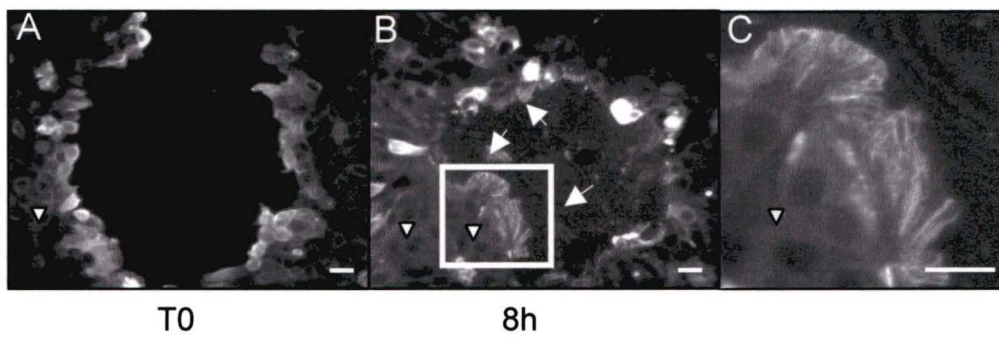
Figure 42. Évaluation de la morphologie cellulaire par un marquage de l'actine-F. Les variations phénotypiques ont été observées dans les monocouches de cellules HGE-17 en étalement après l'induction d'une micro-blessure, en absence (A-F) ou en présence (G, H) de $\text{TGF}\alpha$ (5 ng/ml). Les monocouches de cellules HGE-17 ont été blessées par aspiration à l'aide d'une aiguille et fixées à la formaldéhyde après différents intervalles de temps suivant l'induction de la blessure. L'actine-F a été visualisée par fluorescence suite à l'utilisation de la phalloïdine-FITC. (A, B) Immédiatement après l'induction de la blessure, l'actine-F est localisée à la périphérie des cellules. (C, D) Dans les contrôles, après 4 heures suivant l'induction de la blessure, la micro-blessure est entourée d'une ceinture continue ou anneau de contraction d'actine (flèches blanches). (E, F) Dans les contrôles, après 8 heures suivant l'induction de la blessure, les cellules bordantes s'allongent vers la zone dénudée de la blessure et exhibent des lamelles à la périphérie de la blessure (flèches blanche). (G) En présence de $\text{TGF}\alpha$, après 2 heures, la formation d'un anneau continu d'actine (flèches blanches) est observée en circonférence de la blessure. (H) En présence de $\text{TGF}\alpha$, après 4 heures, la blessure est entourée de lamelles, celles-ci étant pointées par les flèches blanches. (B, D, F) sont des plus forts grossissements des images contenues dans les boîtes blanches. Barres, 50 μM .



heures. À l'opposé, les expériences d'immunofluorescence ont démontré que la tubuline- α reste principalement localisée dans le cytoplasme des cellules de la monocouche adjacente à la blessure et de plus, ces cellules semblent posséder un niveau réduit de microtubules polymérisés (Fig. 43, A-C, voir têtes de flèches). Une distribution similaire de la tubuline- α a été observée dans les monocouches de cellules HGE-17 blessées en présence de TGF α , à l'exception que ces réarrangements du cytosquelette surviennent beaucoup plus rapidement que dans les conditions basales. Par exemple, la formation de lamelles été observée après seulement 4 heures (Fig. 42). De plus, tout comme dans les conditions contrôles, la polymérisation des microtubules a été observée uniquement dans les cellules en étalement localisées à la bordure de la blessure, et non dans les cellules de la monocouche adjacente (résultat non montré). Dans le but de valider la nécessité des réorganisations du cytosquelette pour le processus de réparation des micro-blessures, des inhibiteurs de l'organisation de l'actine et de la polymérisation des microtubules, soit la cytochalasine D et le nocodazole, ont été ajoutés aux monocouches blessées et leurs effets sur la progression de la fermeture des blessures ont été analysés. Tel qu'illustré à la Figure 44, l'ajout du nocodazole a ralenti significativement la progression de la fermeture des blessures, que ce soit en conditions basales (résultats non montrés) ou en présence du facteur de croissance TGF α . D'un autre côté, le traitement à la cytochalasine D a inhibé complètement la fermeture de micro-blessures (Fig. 44). Ces données démontrent ainsi que les réarrangements des filaments d'actine sont nécessaires au processus permettant à un feuillet

Figure 43. Expression de la tubuline- α dans les feuillets épithéliaux de cellules HGE-17 en étalement suivant l'induction d'une micro-blessure. Les cellules ont été blessées puis fixées avec de la formaldéhyde 3,7% pour 12 minutes et perméabilisées avec du Triton X-100 0,1% dilué dans du PBS pour 3 minutes. Les sites de liaison non-spécifiques de l'anticorps ont été bloqués à l'aide de 2% d'albumine de sérum bovin dilué dans du PBS. Les cellules ont par la suite été incubées avec les anticorps primaires, puis avec les anticorps conjugués au FITC dilués dans du BSA-PBS 0,2 % à l'intérieur d'une chambre humidifiée pour 60 minutes et 45 minutes respectivement. **(A)** Immédiatement suivant l'induction de la blessure, la tubuline- α est principalement localisée dans le cytoplasme. **(B, C)** Dans les conditions contrôles, 8 heures suite à l'induction de la blessure, la tubuline- α est principalement redistribuée dans les lamelles situées à la surface des cellules bordant la blessure. **(C)** est un plus fort grossissement de l'image contenue à l'intérieur de la boîte blanche. Barres, 50 μ M.

Tubuline- α

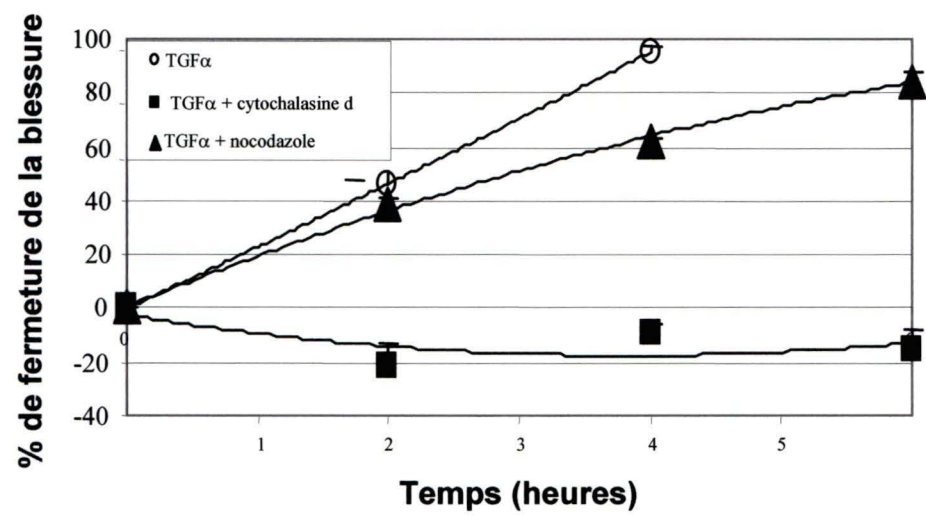


épithélial gastrique de s'étaler rapidement suivant une micro-blessure, alors que la polymérisation des microtubules semble jouer un rôle moins primordial.

3.4 Rôles des voies de signalisation Src, EGFR et PI3K dans l'étalement des cellules épithéliales gastriques

Dans le but de mieux comprendre comment l'induction d'une micro-blessure en condition basale ou stimulée par le facteur de croissance $TGF\alpha$ peut stimuler l'étalement de cellules épithéliales gastriques en bordure de la blessure épithéliale, les voies de signalisation identifiées dans la restitution épithéliale gastrique dans la section précédente ont été examinées. Nous avons démontré qu'une activation rapide de l'EGFR, soit par la tyrosine kinase pp60c-Src ou par l'addition de ses ligands exogènes tels que le $TGF\alpha$, induit la restitution épithéliale gastrique en stimulant différentes voies de signalisation dépendantes de la PI3K. Pour investiguer le rôle des voies Src, EGFR et PI3K, nous avons évalué l'impact de leur inhibition pharmacologique sur la capacité d'étalement des cellules des feuillets épithéliaux gastriques blessés. Tel que démontré à la Figure 45 (A et B), l'inhibition de l'activité de la PI3K par le LY294002 a résulté en une diminution marquée et significative de la progression de la fermeture des micro-blessures, que ce soit en absence (A) ou en présence (B) de $TGF\alpha$. Par la suite, pour déterminer si l'activation de l'EGFR est nécessaire à la réparation des micro-blessures, nous avons utilisé l'inhibiteur de la tyrosine kinase EGFR, PD153035. L'addition de cet inhibiteur a diminué fortement la capacité d'étalement des cellules HGE-17 blessées en présence ou en absence de $TGF\alpha$.

Figure 44. Les réarrangements de l'actine-F et de la tubuline- α sont nécessaires à la modulation de l'étalement des feuilletts épithéliaux gastriques suivant l'induction d'une micro-blessure. Les monocouches de cellules HGE-17 confluentes ont été blessées par aspiration à l'aide d'une aiguille et traitées en présence de 20 mM d'hydroxyurée et de TGF α 5 ng/ml pour une période de 6 heures. Dans certaines expériences, les cellules ont aussi été traitées avec les inhibiteurs cytochalasine D (1 μ M) ou nocodazole (3 μ M) pour une période de 6 heures. Des images de la zone dénudée ont été prises à toutes les 2 heures jusqu'à la fermeture complète de la blessure et le pourcentage de fermeture de la blessure a été déterminé en comparaison avec le diamètre de la zone dénudée mesuré immédiatement après l'induction de la micro-blessure. Ces résultats sont représentatifs de trois différentes expériences.



(Fig. 45, A et B). Finalement, nos observations antérieures établissant que la kinase pp60c-Src est rapidement activée suivant une blessure épithéliale nous a incités à examiner si l'activation de pp60c-Src était également requise pour la modulation de l'étalement des cellules des feuillets épithéliaux gastriques suite à une micro-blessure en condition basale. Tel qu'illustré à la Figure 45A, un pré-traitement au PP2, l'inhibiteur pharmacologique des protéines kinases de la famille Src (Hanke et al., 1996), a ralenti de façon marquée et significative la vitesse de fermeture des blessures induites sur des monocouches de cellules épithéliales gastriques en conditions basales. Par conséquent, l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques a confirmé l'importance des voies de signalisation Src/EGFR/PI3K dans l'étalement des cellules épithéliales gastriques humaines en conditions basales et des voies EGFR/PI3K dans l'étalement cellulaire stimulé au facteur de croissance TGF α suivant une blessure.

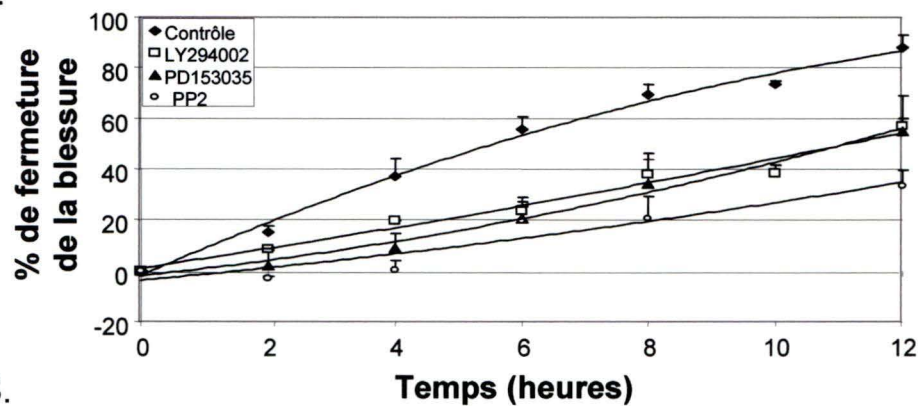
3.5 Les effecteurs en aval de la PI3K, p70S6K et ILK ne sont pas impliqués dans la modulation de l'étalement de cellules épithéliales gastriques suite à une microblessure

Tel que mentionné précédemment, le PtsIns(3,4,5)P₃, un des produits lipidiques de la PI3K, est connu pour contrôler une variété d'effecteurs de signalisation tels que Akt, ILK et p70S6K (Cantrell, 2001). Pour déterminer si l'activation de la voie de signalisation mTOR/p70S6K était impliquée dans la régulation de l'étalement des cellules HGE-17, nous avons incubé les monocouches de

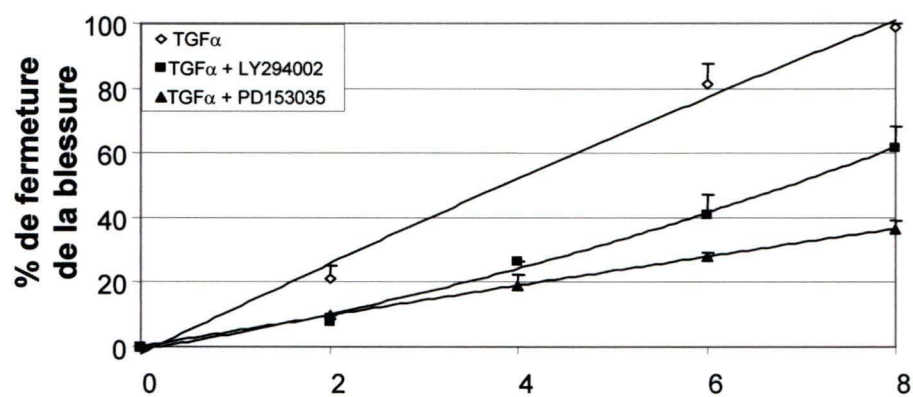
Figure 45. La signalisation via la voie de signalisation EGFR/PI3K est nécessaire à l'étalement cellulaire gastrique en condition basale ou stimulée au TGF α .

A, Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées, incubées dans du FBS 0,1%, traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, en présence ou en absence de DMSO (0,1%) ou de LY294002 (5 μ M) ou de PP2 (5 μ M) ou de PD153035 (10 μ M). Des images de la zone dénudée ont été prises à toutes les 2 heures jusqu'à la fermeture complète de la blessure et le pourcentage de fermeture de la blessure a été déterminé en comparaison avec le diamètre de la zone dénudée mesuré immédiatement après l'induction de la micro-blessure. **B,** Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées, incubées dans du FBS 0,1%, et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée, en absence (DMSO) ou en présence de TGF α 5 ng/ml, de LY294002 (5 μ M) ou de PP2 (5 μ M) ou de PD153035 (10 μ M). Le pourcentage de fermeture de la blessure a été déterminé tel que décrit en A. **C,** Les cellules confluentes ont été blessées, incubées dans du FBS 0,1%, et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée et 5 ng/ml de TGF α , en absence ou en présence de rapamycine (25 nM). Le pourcentage de fermeture de la blessure a été déterminé tel que décrit en A. **D,** Les cellules HGE-17 ont été nucléofectées avec un siRNA contrôle ou avec un siRNA dirigé contre ILK. Les cellules confluentes ont été blessées, incubées dans du FBS 0,1%, et traitées avec 20 mM d'hydroxyurée et 5 ng/ml de TGF α . Le pourcentage de fermeture de la blessure a été déterminé tel que décrit en A. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences.

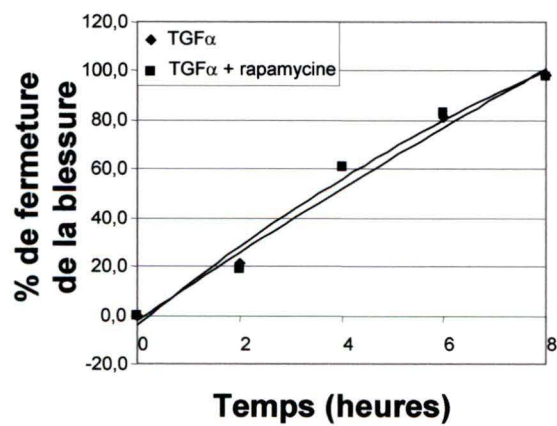
A.



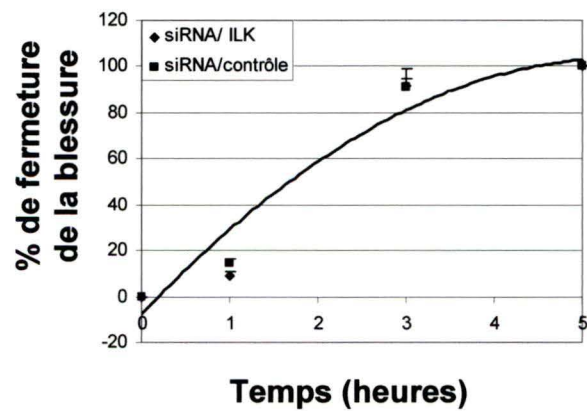
B.



C.



D.



cellules confluentes blessées en présence de la rapamycine (inhibiteur de mTOR) et nous avons analysé ses effets sur la progression de la fermeture des micro-blessures, en présence ou en absence de TGF α . Tel qu'illustré à la Figure 45C, le pré-traitement des cellules HGE-17 n'a pas eu d'effet sur l'étalement cellulaire induit suivant la blessure. Le rôle potentiel de la kinase ILK a aussi été examiné et pour ce faire, un siRNA double-brin dirigé contre la séquence de gène humain d'ILK a été transfecté dans les cellules HGE-17 pour inhiber la synthèse protéique d'ILK. Tel que démontré à la Fig. 36, les cellules transfectées avec le siRNA ciblant ILK a fortement réduit l'expression de la protéine ILK, en opposition au siRNA contrôle. Ce siRNA a ainsi été utilisé subséquemment pour analyser si la réduction d'ILK affecte la progression de la fermeture des micro-blessures. Pour ce faire, les monocouches de cellules HGE-17 confluentes transfectées avec le siRNA/ILK ont été blessées et le pourcentage de fermeture de la blessure, en comparaison au siRNA contrôle, a été déterminé. Tel que démontré à la Figure 45D, la réduction de l'expression d'ILK n'a pas ralenti la progression de la fermeture des blessures, en comparaison au siRNA contrôle.

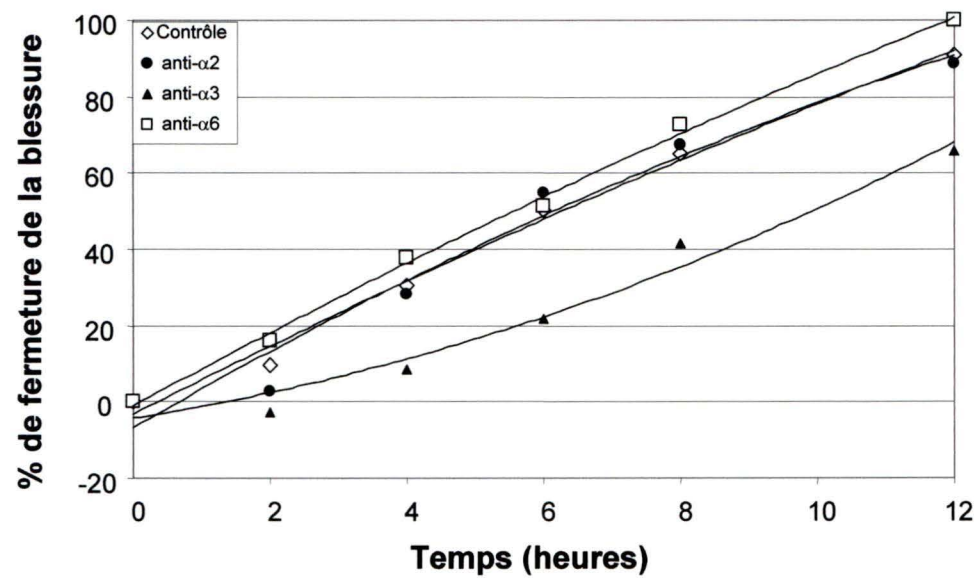
3.6 L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ contrôle l'étalement des feuillettes de cellules épithéliales gastriques suite à une microblessure

Tel que mentionné précédemment, il est possible que l'événement initiateur du mouvement du feuillet épithélial gastrique dans notre système soit l'interaction des récepteurs situés à la surface cellulaire avec les éléments de la matrice

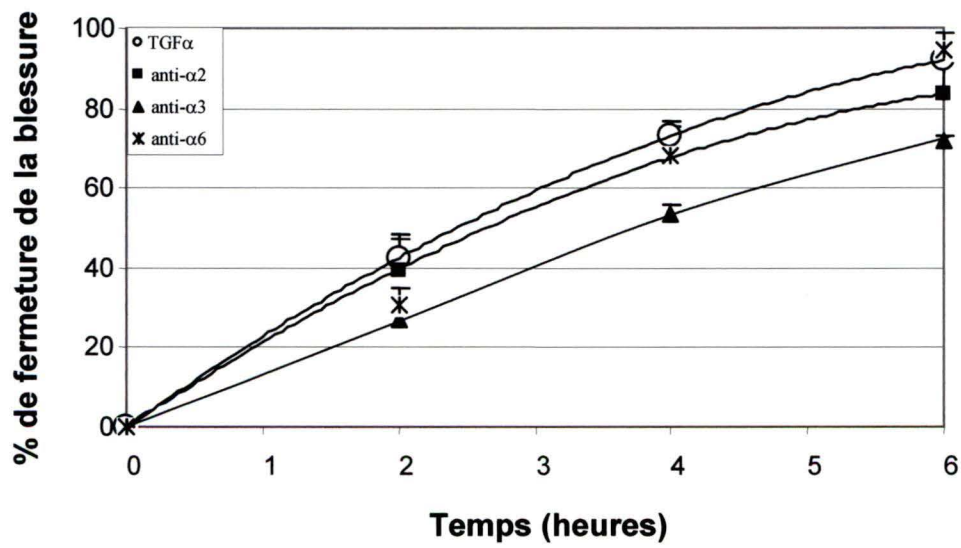
extracellulaire. Les intégrines sont des protéines réceptrices transmembranaires connues pour se lier aux molécules de la matrice extracellulaire. De plus, les intégrines ont été démontrées pour coopérer avec les récepteurs des facteurs de croissance tels que l'EGFR (Moro et al., 2002). Nous avons observé dans des études antérieures que l'expression coordonnée des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des intégrines et la redistribution de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ constituent des événements clés pour la différenciation des cellules de sécrétion de l'épithélium gastrique humain (Tremblay et Ménard, 1996; Chénard et al., 2000), nous incitant ainsi à analyser leur implication potentielle dans la modulation de l'étalement cellulaire suivant une micro-blessure. Ainsi, nous avons effectué des essais de neutralisation des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des intégrines dans des monocouches de cellules HGE-17 blessées. Tel qu'illustré à la Figure 46 (A et B), l'addition d'un anticorps neutralisant (5 $\mu\text{g/ml}$) dirigé contre la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines a ralenti fortement et significativement la vitesse de fermeture des blessures, en absence (A) ou en présence (B) de $\text{TGF}\alpha$. À notre grande surprise, la neutralisation de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines n'a eu aucun effet significatif sur l'étalement des cellules HGE-17 blessées en présence ou en absence de $\text{TGF}\alpha$ (Fig. 46, A et B). L'implication potentielle de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines, ayant été démontrée antérieurement pour être impliquée dans la migration des cellules épithéliales intestinales (Lotz et al., 2000), a aussi été examinée. Tel que montré à la Figure 46 (A et B), la neutralisation de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines n'a pas altéré de manière significative la vitesse de fermeture des micro-blessures, que ce soit en présence ou en absence de $\text{TGF}\alpha$.

Figure 46. L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est nécessaire pour l'étalement des cellules épithéliales gastriques suivant l'induction d'une micro-blessure, en conditions basales ou en présence de $TGF\alpha$. Les cellules HGE-17 confluentes ont été blessées, incubées dans du FBS 0,1%, et en absence **(A)** ou en présence **(B)** de $TGF\alpha$ (5 ng/ml) et en présence ou en absence d'anticorps neutralisants dirigés contre les sous-unités $\alpha 2$ (5 μ g/ml), $\alpha 3$ (5 μ g/ml) et $\alpha 6$ (1 μ g/ml) des intégrines. Des images de la zone dénudée ont été prises à toutes les 2 heures jusqu'à la fermeture complète de la blessure et le pourcentage de fermeture de la blessure a été déterminé en comparaison avec le diamètre de la zone dénudée mesuré immédiatement après l'induction de la micro-blessure. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard d'au moins 3 différentes expériences.

A.



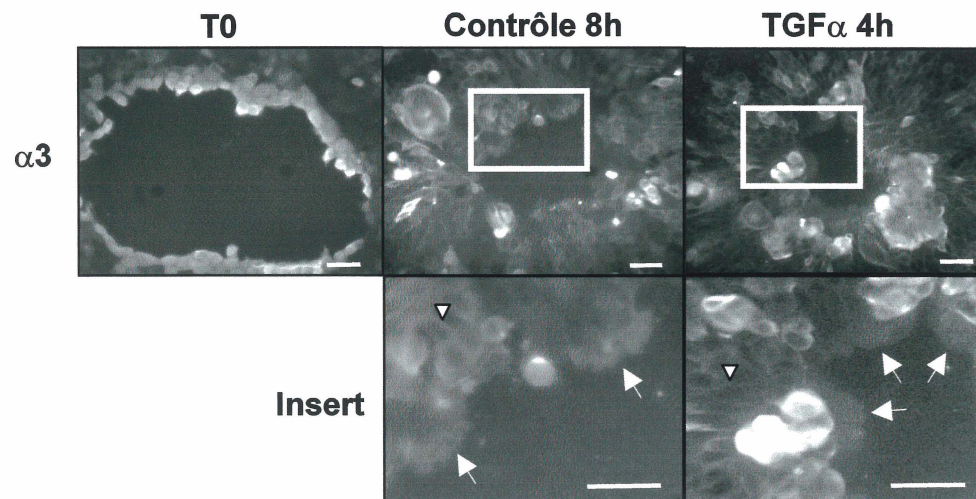
B.



Dans le but de déterminer comment la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines contribue à l'étalement des cellules HGE-17 suite à une micro-blessure, l'immunolocalisation de cette sous-unité a été évaluée à différents intervalles de temps durant le processus de réparation des blessures. Tel qu'illustré à la Figure 47A, la sous-unité $\alpha 3$ est localisée dans le cytoplasme des cellules de la monocouche adjacente à la blessure (panneaux du bas, voir têtes de flèches), alors que celle-ci est redistribuée dans les lamelles des cellules entourant la blessure (Fig. 47A, panneaux du bas, voir flèches). Par la suite, dans le but de mieux comprendre comment la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines régule l'étalement des feuilletts épithéliaux, des essais de neutralisation ont été effectués à différents intervalles de temps et les distributions de l'actine-F et de la tubuline- α ont été examinées. Tel qu'illustré à la Figure 47B (voir flèches blanches), la neutralisation de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines a réduit fortement la formation des lamelles cytoplasmiques dans les conditions stimulées 4 heures au TGF α . De plus, un traitement avec l'anticorps anti- $\alpha 3$ a atténué de façon remarquable la polymérisation des microtubules dans les quelques lamelles encore présentes au niveau des cellules bordant la blessure (Fig. 47C, voir flèches blanches). Par conséquent, l'ensemble de ces observations suggèrent que l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, mais non $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ est impliquée dans la formation des lamelles au niveau des cellules en étalement suivant l'induction d'une micro-blessure dans les monocouches de cellules épithéliales gastriques humaines.

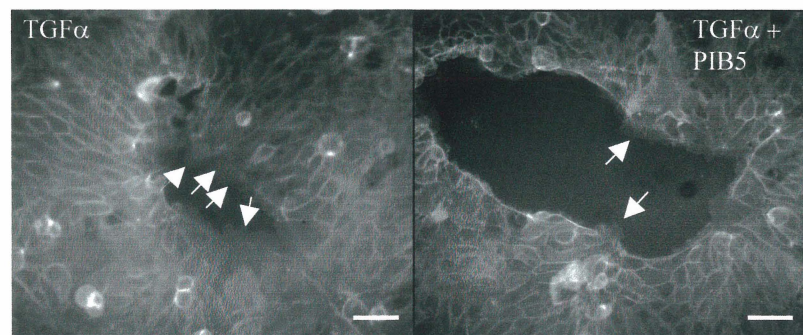
Figure 47. L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ régule la formation des lamelles suivant l'induction de micro-blessures au niveau des monocouches épithéliales gastriques. **A,** Les monocouches de cellules HGE-17 blessées stimulées ou non au TGF α (5 ng/ml) pendant 4 heures ont été fixées avec de la formaldéhyde 3,7% puis marquées par immunofluorescence pour la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines. Les pointes de flèches indiquent la localisation cytoplasmique de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines dans le cytoplasme des cellules de la monocouche adjacente à la blessure. **B-C,** Les monocouches de cellules HGE-17 blessées et stimulées au TGF α (5 ng/ml) pendant 4 heures, en présence ou en absence d'un anticorps neutralisant contre la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines (PIB5, 5 μ g/ml) ont été fixées avec de la formaldéhyde 3,7% et marquées avec la phalloïdine-FITC (**B**) ou avec la tubuline- α (**C**) par immunofluorescence. Les flèches blanches pointent la présence de lamelles cytoplasmiques dans les cellules entourant la blessure. Barres, 50 μ M ; Insert, 50 μ M.

A.



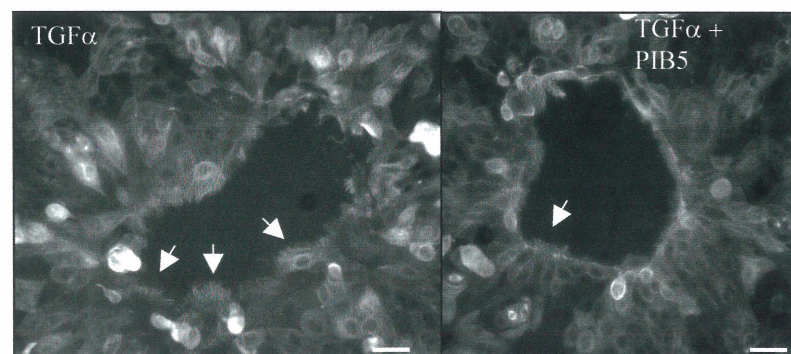
B.

Actine-F



C.

Tubuline- α



IV- DISCUSSION

L'épithélium simple de la muqueuse gastrique assume des fonctions spécialisées de digestion et de sécrétion, en plus d'exercer une fonction de barrière de protection contre un large spectre de substances potentiellement dommageables (acide chlorhydrique, alcool, bactéries pathogènes, anti-inflammatoires non stéroïdiens, etc.) présentes dans la lumière de l'estomac. Cependant, ce système de protection n'est pas infaillible puisque suivant un bris de cette barrière épithéliale, des dommages structuraux et/ou fonctionnels plus ou moins importants peuvent survenir au niveau de la muqueuse, ce qui favorise entre autres le développement d'ulcérations à long terme.

Fort heureusement, l'épithélium de la muqueuse gastrique possède une capacité intrinsèque de réparation appelée régénération épithéliale qui repose sur une activation ordonnée d'événements cellulaires (Lacy, 1995; Tarnawski, 1995). Généralement, les lésions restreintes au niveau de l'épithélium et de dimensions réduites peuvent être réparées en quelques heures seulement. Dans ces situations de micro-blessures, le processus de réparation repose uniquement sur l'étalement des cellules bordant la blessure. Toutefois, dans le cas de lésions plus importantes, la migration cellulaire est également stimulée pour compléter l'étalement des cellules bordant la blessure. Par la suite, dans le but de rétablir la densité cellulaire, cette phase de restitution est suivie d'une phase de prolifération compensatoire, ce qui viendra compléter le processus de régénération épithéliale. Finalement, une fois complétée, la régénération sera suivie d'une séquence ordonnée de re-différenciation visant à rétablir l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium.

L'acquisition des fonctions épithéliales spécialisées de la muqueuse gastrique telles que la régénération épithéliale dépend : 1) des interactions complexes de facteurs de croissance avec leurs récepteurs membranaires spécifiques, 2) d'interactions cellule-cellule ou encore cellule-matrice, 3) de voies de signalisations spécifiques. Cependant, dans le contexte de l'estomac, ces concepts de régénération épithéliale ont été jusqu'à maintenant très peu étudiés. Ceci s'explique par l'absence de modèles expérimentaux représentatifs de l'épithélium gastrique permettant l'étude *in vitro* des phénomènes cellulaires et moléculaires impliqués dans le contrôle de ce processus. Toutefois, la mise au point récemment dans notre laboratoire de trois nouveaux modèles cellulaires (cultures primaires d'estomac foetal humain, lignées épithéliales gastriques HGE-17 et HGE-20) représentatifs de l'épithélium gastrique humain normal nous a permis de définir l'objectif central suivant : définir par quels mécanismes cellulaires et moléculaires les facteurs de croissance modulent les différentes phases de la régénération épithéliale gastrique humaine.

C'est dans cet ordre d'idée que des essais *in vitro* de régénération ont été entrepris dans notre laboratoire. Pour ce faire, un protocole de blessure avec une lame de rasoir ayant été originalement établi sur des lignées épithéliales intestinales (Ciacci et al., 1993) a été employé. Les analyses morphologiques démontrent clairement que suivant des essais de 36-40h, la régénération est significative dans les conditions basales (réduites en sérum) et que le phénotype épithélial est altéré. En effet, certaines cellules retrouvées à la marge de la blessure exhibent un cytoplasme étalé alors que d'autres forment des structures migratoires (filopodes et lamellipodes). De plus, un marquage au

Ki-67 des monocouches épithéliales gastriques blessées nous a permis d'observer la présence de cellules prolifératives après 24h suivant l'induction de la blessure. D'autre part, un marquage TUNEL nous a permis de confirmer que l'apoptose constitue un événement rare dans les monocouches épithéliales gastriques en régénération. Ainsi, les monocouches de cellules épithéliales gastriques subissent des altérations phénotypiques similaires à celles rapportées dans d'autres lignées cellulaires épithéliales gastro-intestinales suivant une blessure (Ciacci et al., 1993; Kato et al., 1999; Basson et al., 1996; Nusrat et al., 1992).

Après avoir confirmé la validité de nos modèles cellulaires pour l'étude de la régénération épithéliale, la capacité de réponse des monocouches épithéliales gastriques HGE-17 blessées à différents facteurs de croissance exogènes (TGF α , EGF, HGF, IGF-I, IGF-II, TGF β 1) a été vérifiée. Les résultats obtenus démontrent clairement que la régénération épithéliale gastrique est hautement régulée par plusieurs facteurs de croissance exogènes : EGF>TGF α >HGF>IGF-I,-II. Les effets des différents facteurs de croissance ont également été analysés au niveau des cellules épithéliales gastriques HGE-20, une lignée cellulaire possédant un statut fonctionnel plus différencié que les cellules HGE-17. À l'exception des facteurs de croissance EGF/TGF α , il a été intéressant d'observer que la réponse des cellules HGE-20 aux différents facteurs de croissance est similaire, bien que beaucoup plus atténuée en comparaison aux cellules HGE-17. Cette observation concorde tout à fait avec les évidences de la littérature ayant rapporté que suivant une blessure épithéliale, les cellules doivent à priori subir un processus de dé-différenciation avant d'être induites à s'étaler et à migrer (Lacy, 1995).

Conséquemment, nous avons choisi la lignée cellulaire HGE-17 comme modèle de référence dans les essais de régénération/restitution. Néanmoins, ces résultats s'avèrent d'une importance particulière puisqu'ils nous ont fourni des informations supplémentaires sur le comportement des cellules plus différenciées de l'épithélium de surface.

Dans une seconde série d'expérimentations, l'addition simultanée d'hydroxyurée aux monocouches épithéliales gastriques blessées nous a permis de concentrer notre analyse de l'effet des facteurs de croissance spécifiquement sur la phase initiale de la régénération, soit la restitution épithéliale. Il est important de mentionner qu'à des concentrations de 20mM, cet agent pharmacologique permet de bloquer efficacement la prolifération cellulaire sans néanmoins affecter la viabilité cellulaire. De plus, il est intéressant de noter que l'ajout d'hydroxyurée n'abolit pas l'effet inducteur des différents facteurs de croissance sur la migration des cellules épithéliales gastriques. Cette observation démontre clairement un rôle des facteurs de croissance spécifiquement sur la restitution au cours du processus de régénération épithéliale ($TGF\alpha$ >EGF>HGF>IGF-I,-II) et, en sus de leur capacité à stimuler la mitogénèse des cellules HGE-17.

Puisque les cellules HGE-17 sont dérivées de la lignée cellulaire de carcinome gastrique NCI-N87 (Chailier et Ménard, 2005), il était extrêmement important de valider l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à maintenant dans un modèle de cellules épithéliales gastriques normales afin de s'assurer que les phénomènes observés n'étaient pas uniquement spécifiques aux cellules gastriques cancéreuses. Les essais avec les

facteurs de croissance ont également été reproduits sur des monocouches des cellules épithéliales gastriques normales en culture primaire en absence de matrice extracellulaire. Dans ce modèle, le facteur de croissance exogène HGF est plus efficace que les facteurs de croissance EGF et TGF α , ce qui illustre possiblement une sensibilité différente de l'épithélium gastrique fœtal en culture primaire. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette observation résulte d'une plus forte expression de c-met dans l'épithélium fœtal (Kermorgant et al., 1997) ou encore nous pouvons supposer que ce résultat est le reflet d'une caractéristique fonctionnelle de l'épithélium gastrique normal (Takahashi et al., 1995).

Les essais *in vitro* de restitution nous ont également permis de démontrer que, contrairement à l'épithélium intestinal, les facteurs de croissance induisent des effets spécifiques sur la migration des cellules épithéliales gastriques indépendamment de la voie du TGF β (Ciacci et al., 1993; Dignass et Podolsky, 1993). En effet, certaines études ont rapporté que les actions de nombreux facteurs de croissance exogènes et cytokines sur la restitution des cellules épithéliales intestinales IEC-6 étaient médiées par un relâchement exogène du facteur de croissance TGF β 1. Ces études démontraient également l'abolition des effets stimulateurs des facteurs de croissance sur la migration des cellules IEC-6 suivant un traitement simultané des monocouches blessées avec un anticorps neutralisant pan-spécifique dirigé contre le TGF β . Or, dans notre système, il faut se rappeler qu'une stimulation au TGF β 1 n'influence pas la restitution des cellules HGE-17. De plus, l'ajout d'un anticorps neutralisant anti-TGF β n'affecte pas la réponse des monocouches épithéliales blessées suivant une stimulation

avec le facteur de croissance $TGF\alpha$. Comme de nombreuses lignées cellulaires d'origine cancéreuses possèdent une dérégulation de la voie de signalisation du $TGF\beta$ (Pring et al., 2006; Qiu et al., 2007; Kretschmar, 2000), la capacité de réponse de la lignée cellulaire HGE-17 à ce facteur de croissance a également été vérifiée en effectuant des essais luciférase avec le gène rapporteur 3TP-Luc. Ce non-effet du $TGF\beta 1$ a aussi été validé dans les cultures primaires de cellules épithéliales gastriques normales, suggérant clairement l'existence de mécanismes différents de ceux proposés pour la restitution épithéliale intestinale.

À priori, l'observation que la plupart des facteurs de croissance exogènes testés dans cette étude stimulent la régénération et la restitution épithéliales gastriques semblaient suggérer une redondance fonctionnelle possible. Toutefois, tel que suggéré pour les cellules intestinales (Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1993), les analyses morphologiques du comportement des cellules épithéliales gastriques en restitution (microscopie optique, microscopie électronique, microscopie à fluorescence) ont révélé que non seulement les facteurs de croissance EGF, $TGF\alpha$, HGF et IGF-I induisaient des effets positifs sur la restitution des cellules HGE-17, mais que ceux-ci altéraient de façon différentielle le phénotype des cellules bordant la blessure. En effet, EGF/ $TGF\alpha$ et HGF stimulent la formation de structures migratoires (lamellipodes) et diminuent l'intensité du marquage de la cadhérine-E associée aux jonctions cellule-cellule par une re-distribution de la protéine de la membrane vers le cytoplasme. De leur côté, les composantes des jonctions serrées ZO-1 et occludine sont modulées de façon moins sensible suivant l'induction d'une blessure. De plus, les facteurs de croissance

exogènes EGF/TGF α stimulent très efficacement l'étalement cytoplasmique, accroissant ainsi de façon remarquable la dimension des cellules à la marge de la blessure. L'effet de l'EGF et du TGF α sur l'étalement cellulaire et sur la redistribution des protéines jonctionnelles de la membrane vers le cytoplasme a été rapporté antérieurement dans la littérature dans d'autres modèles cellulaires tels que dans les cellules épithéliales alvéolaires, les cellules d'adénocarcinomes cervicaux et les cellules d'adénocarcinomes de côlon (Kheradmand et al., 1994; Pichard et al., 2001; Yamanaka et al., 2003). Aussi, bien que l'EGF et le TGF α ont été en mesure d'activer l'étalement cytoplasmique des cellules bordant la blessure, il est intéressant de noter que seul le TGF α a induit des effets maximaux sur l'activité protrusive des cellules. De telles différences au niveau des actions de l'EGF et du TGF α sur la contractilité du cytosquelette et/ou sur la migration ont déjà été rapportées dans d'autres systèmes expérimentaux incluant fibroblastes, kératinocytes, hépatocytes et cellules intestinales de rat (Podolsky, 1994), supportant ainsi les présentes observations. Des affinités différentielles des ligands pour l'épitope de l'EGFR aussi bien que des affinités différentes causant des augmentations variables de l'activité MAPK pourrait expliquer de telles variations (Stromblad et Anderson, 1993; Thoresen et al., 1998). Ainsi, il semble que l'EGF et le TGF α suscitent des réponses qui ne sont pas identiques, ce qui peut fournir une explication concernant les voies par lesquelles ces 2 facteurs de croissance sont délivrés (Chailler et Ménard, 1999) : EGF est relâché dans la lumière intestinale et dans le sang (exocrine, endocrine) alors que le TGF α représente la forme majeure produite localement (autocrine, paracrine) dans les cryptes intestinales et les glandes gastriques (Cartlidge et Elder, 1989; Hormi et Lehy, 1994). De son côté, HGF active plutôt

l'allongement de groupes de cellules, bien que l'étalement cellulaire soit aussi stimulé de façon modérée. Suite aux analyses morphologiques, le phénotype obtenu suivant une stimulation au HGF a été clairement associé avec l'étirement des cellules « leader » situées à l'extrémité des groupements de cellules en migration, induisant conséquemment une migration beaucoup plus directionnelle de la monocouche en comparaison à la condition basale. De plus, ces cellules « leader » exhibent généralement un énorme lamellipode unique orienté de façon perpendiculaire à la blessure, à l'opposé des cellules « leader » stimulées par l'EGF et le TGF α dans lesquelles de multiples protrusions non orientées sont observées sur une même cellule. L'HGF est un régulateur bien connu de la migration cellulaire épithéliale (Birchmeiser et Gherardi, 1998; Komada et Kitamura, 1993; Grottegut et al., 2006). Par exemple, dans les cellules épithéliales gastriques de souris IMGE-5, l'HGF a été démontré pour causer une relocalisation partielle de la protéine des jonctions serrées ZO-1, stimulant ainsi la dissociation cellulaire et la migration (Hollande et al., 2001). Finalement, les facteurs de croissance IGF-I et -II réduisent la fréquence des structures migratoires et activent l'alignement rapide du front de migration. De plus, en comparaison avec EGF, TGF α et HGF, la stimulation de la restitution des cellules HGE-17 avec les IGFs n'induit pas une re-distribution des différentes protéines jonctionnelles, induisant ainsi un front de migration beaucoup plus compact. Bien que le patron d'expression des IGFs n'a pas encore été analysé à ce jour dans le contexte de la cicatrisation d'ulcères gastriques *in vivo*, les IGFs ont été associés avec l'adaptation de la muqueuse et la croissance cellulaire suivant une résection intestinale (Clemmons, 1998). Concrètement, ces données s'opposent ainsi pour la première fois à l'idée d'une redondance fonctionnelle

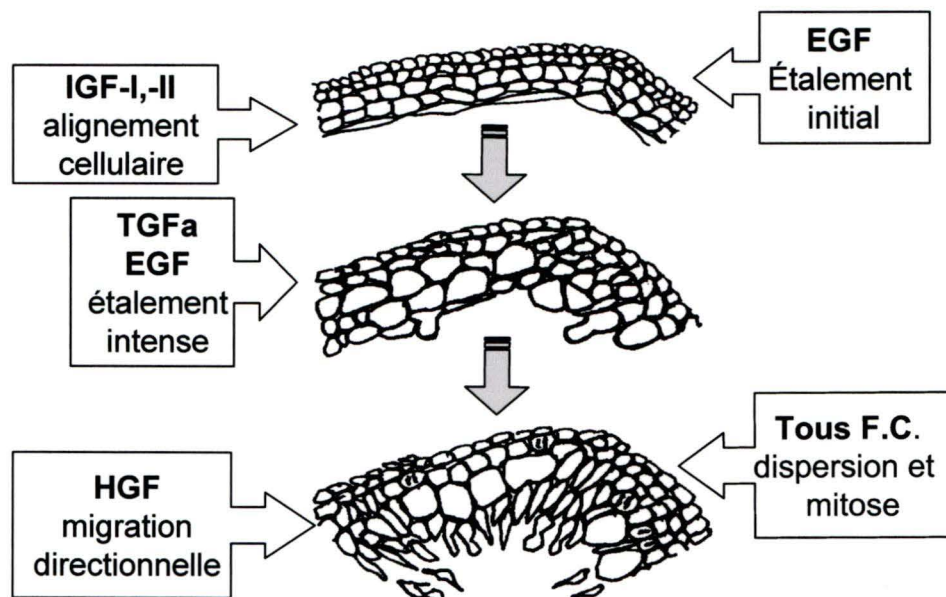
des facteurs de croissance EGF, TGF α , HGF et IGFs et suggèrent que la progression normale de la ré-épithélialisation suivant une blessure repose sur la coordination des activités des facteurs de croissance impliqués.

À l'heure actuelle, les données d'hybridation *in situ* effectuées sur des ulcérations gastriques suggèrent que l'expression de certains gènes serait modulée de façon différentielle en fonction du temps au cours de la régénération épithéliale (phase précoce, intermédiaire et tardive) (Fig. 8). En combinant les résultats obtenus dans le cadre de cette étude avec ceux obtenus *in vivo* au niveau des ulcérations gastriques, nous pouvons proposer le modèle d'intégration suivant pour le rôle des facteurs de croissance (Figure 48). Peu de temps après l'induction d'une blessure, les facteurs de croissance luminaux IGFs et EGF relâchés par le tissu activent l'alignement des cellules bordant la blessure et initient l'étalement cytoplasmique. Par la suite, l'augmentation de l'expression des gènes liés à l'EGF intensifie l'étalement cellulaire. Puis, la stimulation de l'expression des gènes de l'HGF et de son récepteur c-met vont coordonner la phase active de migration en induisant plus particulièrement la migration directionnelle des cellules épithéliales vers la zone dénudée de la blessure. Finalement, si l'ampleur de la blessure l'exige, une exposition prolongée à tous ces facteurs de croissance permettra la dispersion cellulaire et le rétablissement de la densité cellulaire grâce à l'induction de la prolifération cellulaire.

Ainsi, l'analyse de l'effet de différents facteurs de croissance exogènes nous a permis de dresser une liste détaillée des régulateurs capables de stimuler spécifiquement la

Figure 48. Représentation schématique de l'action différentielle des facteurs de croissance sur les cellules épithéliales gastriques humaines blessées (cellules HGE-17) et sur les différents événements cellulaires impliqués dans la séquence de régénération épithéliale. Peu de temps après l'induction d'une blessure, les facteurs de croissance IGFs et EGF relâchés par le tissu induisent l'alignement des cellules bordantes et initient l'étalement cellulaire. Par la suite, l'augmentation de l'expression de l'EGF et de son récepteur EGFR intensifie l'étalement cytoplasmique et l'activité protrusive non-orientée des cellules bordant la blessure. La stimulation de l'expression des gènes de l'HGF et de son récepteur c-met coordonne, quant à elle, l'élongation et la migration directionnelle des cellules épithéliales vers la blessure. Finalement, si l'ampleur de la blessure l'exige, tous ces facteurs de croissance vont induire après 24-40h la dispersion cellulaire et le rétablissement de la densité cellulaire grâce à l'induction de la prolifération cellulaire. F.C. : Facteurs de croissance.

	alignement	étalement	motilité	dispersion	prolifération
IGF-I,-II	■	□	□	□	■
EGF	□	■	↖ ↗	■	■
TGF α	□	■	↖ ↗	■	■
HGF	□	■	↑	■	□



phase initiale de restitution épithéliale suivant une blessure. Toutefois, suivant cette première étude, une question fondamentale restait encore en suspend : entre le moment où un facteur de croissance se lie à son récepteur et le moment où se traduit une réponse cellulaire spécifique (qui dans ce cas-ci est la restitution épithéliale), que se passe-t-il spécifiquement au niveau de la signalisation intracellulaire? En effet, notre compréhension des voies de signalisation spécifiques qui transmettent les signaux extracellulaires régulant la restitution épithéliale gastrique suivant une blessure est loin d'être complétée et ce, particulièrement chez l'humain (Tarnawski, 2005). La seconde partie du travail a donc consisté à identifier et à caractériser les voies de signalisation intracellulaires contrôlant la restitution épithéliale gastrique humaine suivant une blessure, en condition basale et suivant une stimulation en prenant le facteur de croissance exogène TGF α comme stimulateur-type.

Dans un premier temps, deux grandes voies de signalisation classiques connues pour être activées suivant une stimulation aux facteurs de croissance ont été examinées, soit MEK1/ERK1/2 et PI3K/Akt. Nous avons tout d'abord établi que la cascade de signalisation MEK1/ERK1/2 est rapidement stimulée suivant une blessure. Cependant, nous avons également démontré que l'inhibition de l'activation de MEK1/ERK1/2 à l'aide de l'inhibiteur pharmacologique PD98059 n'altère pas la capacité de restitution des cellules HGE-17 en condition basale ou suivant une stimulation au facteur de croissance exogène TGF α . À priori, cette observation semble en opposition avec des données obtenues *in vivo* ayant démontré une augmentation drastique (400-900%) de l'activité de ERK1/2 suivant l'induction d'ulcérations gastriques chez le rat (Tarnawski, 2001;

Tarnawski, 2000; Pai et Tarnawski, 1998). Cependant, il est important de se rappeler que les approches *in vivo* effectuées sur des ulcères gastriques ne permettent pas de discriminer les différents événements cellulaires qui composent la régénération épithéliale (étalement, migration, prolifération). Par conséquent, notre modèle *in vitro* de cellules épithéliales gastriques blessées en présence d'hydroxyurée s'est avéré être un modèle idéal pour caractériser spécifiquement les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le contrôle de la restitution épithéliale. Cependant, malgré l'observation que la cascade MEK1/ERK1/2 n'est pas impliquée dans le contrôle de la restitution épithéliale gastrique, nous savons que l'activation de cette voie de signalisation joue un rôle important dans le processus global de la régénération épithéliale et ce, probablement au niveau du contrôle de la prolifération cellulaire. En effet, il est intéressant de noter que l'inhibition de l'activation de la cascade de signalisation MEK1/ERK1/2 à l'aide du PD98059 dans nos cellules HGE-17 provoque une diminution significative de la prolifération cellulaire dans des essais *in vitro* de régénération épithéliale gastrique (i.e. en absence hydroxyurée) de 40h (résultats non montrés).

Dans un deuxième temps, le rôle potentiel de la voie de signalisation PI3K/Akt dans le contrôle de la restitution épithéliale gastrique humaine a été analysé. Tout d'abord, dans des essais de restitution en condition basale et stimulée au TGF α , nous avons démontré que les niveaux d'activation d'Akt, la cible la plus connue de la PI3K, augmentent rapidement et fortement suivant une blessure. De plus, nous avons observé que cette augmentation des niveaux d'activation d'Akt est complètement abolie lorsque l'activité de la PI3K est inhibée dans les cellules épithéliales gastriques blessées. En

accord avec ces observations, nos résultats démontrent clairement que l'inhibition de l'activité de la PI3K avec le LY294002 réduit considérablement (50-70%) la capacité de migration des cellules HGE-17 blessées en condition basale ou stimulées au $TGF\alpha$. L'ensemble de ces résultats confirme ainsi que l'activation d'Akt et de la migration cellulaire constituent deux événements dépendants de la PI3K. D'un autre côté, comme les traitements à l'inhibiteur de la PI3K LY294002 n'ont réduit que de moitié la capacité de migration des cellules HGE-17 et des cultures primaires gastriques suite à une stimulation au $TGF\alpha$, ces données suggèrent également l'implication de voies de signalisation indépendantes de la PI3K au cours de la restitution épithéliale gastrique stimulée par le $TGF\alpha$. L'implication potentielle de voies de signalisation indépendantes de la PI3K sera donc une avenue intéressante à investiguer dans le futur.

La PI3K apparaissait donc comme un candidat majeur dans le contrôle du processus de restitution épithéliale gastrique suivant une blessure. En accord avec cette hypothèse, nous avons clairement établi que la PI3K joue un rôle central et précoce dans la modulation de la restitution épithéliale gastrique humaine. Premièrement, nous avons démontré que l'inhibition de l'activité de la PI3K avec le LY294002 inhibe fortement la capacité de restitution des cellules épithéliales gastriques humaines en culture primaire, que ce soit en présence ou en absence du facteur de croissance exogène $TGF\alpha$. Deuxièmement, un traitement avec un composé synthétique de $PtdIns(3,4,5)P_3$ est suffisant pour induire fortement la migration des cellules HGE-17 suivant une blessure et ce, à des niveaux comparables à ceux obtenus suivant une stimulation au $TGF\alpha$. Troisièmement, un traitement avec l'inhibiteur LY294002 durant la première heure

seulement suivant une blessure est suffisant pour diminuer la vitesse de migration des cellules HGE-17, suggérant ainsi une implication précoce de la PI3K dans la régulation de la restitution épithéliale gastrique. Ce rôle central de la PI3K est en accord avec une étude ayant rapporté une diminution de la capacité de migration des cellules épithéliales gastriques de souris IMGE-5 suivant une inhibition de l'activité de la PI3K avec le LY294002 (Hollande et al., 2001). Le rôle physiologique de la PI3K a également été analysé dans la régénération épithéliale gastrique de rats avec une hypertension portale (PHT) (Tsugawa et al., 2003). En effet, il a été observé que les mécanismes de réparation de la muqueuse gastrique de ces rats sont grandement altérés suivant l'induction d'ulcères avec de l'éthanol. D'un point de vue moléculaire, cette dysfonction a d'ailleurs été associée à des niveaux d'expression élevés de la phosphatase PTEN sous-forme active et à des niveaux d'activation altérés de la voie de signalisation PI3K/Akt.

Dans le but de dresser un portrait plus global du rôle de la PI3K dans la régulation de la restitution épithéliale gastrique humaine, les rôles spécifiques de différents effecteurs potentiels de la kinase ont été analysés. En guise de rappel, les PIP₃, un des produits lipidiques de la PI3K, agissent comme site d'ancrage pour un sous-groupe de protéines contenant un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) (Downes et al., 2005; Wymann et Marone, 2005). Parmi ces protéines, on retrouve PDK1, une protéine kinase reconnue pour réguler l'activation d'Akt et d'ILK (Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). Une fois activée, Akt agit par la suite sur le contrôle de plusieurs enzymes critiques telles que mTOR, une protéine impliquée dans la synthèse protéique connue pour activer la p70S6K. À notre étonnement, nous avons observé qu'une activation constitutive active

d'Akt n'augmente pas la capacité de migration des cellules HGE-17 suivant une blessure. Pourtant, le rôle d'Akt dans la migration cellulaire et l'invasion tumorale a été rapporté dans plusieurs modèles cellulaires tels que carcinomes de langue humaine et fibroblastes (Grille et al., 2003; Qian Y et al., 2004). D'un autre côté, la surexpression d'une forme constitutive active de la sous-unité catalytique de la PI3K a été démontrée pour augmenter la dispersion cellulaire des cellules épithéliales MDCK, ce qui n'a toutefois pas été le cas suivant la surexpression d'une forme constitutive active d'Akt (Khwaja et al., 1998). De plus, dans les trophoblastes, l'EGF a été rapporté pour stimuler la migration cellulaire et la phosphorylation d'Akt et de la p70S6K. Cependant, l'expression d'une forme active d'Akt a échoué dans la stimulation de la migration cellulaire, mais a bel et bien augmenté les niveaux d'activation de la p70S6K, suggérant ainsi qu'un Akt actif est nécessaire mais insuffisant pour stimuler la migration des trophoblastes (Qiu et al., 2004). Puisque nos résultats démontrent que l'activation d'Akt n'est pas suffisante pour l'induction de la migration des cellules HGE-17, ceux-ci sont ainsi en accord avec ces études. Cependant, il est important de souligner que dans notre système, l'activation d'Akt serait nécessaire puisque nous avons démontré que l'activation de son effecteur mTOR est requise pour une restitution épithéliale gastrique maximale. En effet, nos données sur l'analyse de l'activation des voies de signalisation en aval de la PI3K nous ont permis d'identifier clairement l'effecteur mTOR/p70S6K. Ces observations sont en accord avec des études précédentes ayant rapporté le rôle de mTOR/p70S6K (Chandrasekher et al., 2001; Qian et al., 2004) dans la réparation de monocouches blessées de différents types cellulaires. En effet, l'expression d'une forme constitutive active de p70S6K dans les fibroblastes embryonnaires de poulet a été démontrée pour être suffisante pour l'induction du remodelage des filaments d'actine,

menant ainsi à la formation de lamellipodes et de filopodes, à une diminution de la formation des fibres de stress et à une augmentation de la migration cellulaire (Qian et al., 2004). Il est aussi important de mentionner que l'inhibiteur LY294002 peut directement affecter la signalisation de mTOR et ce, à des doses similaires à celles requises pour inhiber l'activité kinasique de la PI3K (Brunn et al., 1996). Nos données sur l'analyse de l'activation des voies de signalisation en aval de la PI3K nous ont également permis d'identifier la kinase ILK, un effecteur connu de la PI3K (Acconcia et al., 2006; Wymann et Pirola, 1998; Wu, 1999). Le rôle d'ILK dans le contrôle de la migration cellulaire et la réorganisation du cytosquelette a été largement décrit dans la littérature (Qian et al., 2005; Acconcia et al., 2006; Filipenko et Attwell, 2005; Zhang et al., 2002). Dans les cellules de fibroblastes embryonnaires de poulet, ILK a été démontré pour induire des réarrangements au niveau des filaments d'actine, plus précisément en stimulant la formation de structures migratoires via une activation de la p70S6K et Rac-1 (Qian et al., 2005). Une avenue de recherche intéressante à envisager se situe au niveau des autres isoformes d'Akt, soit Akt2 et Akt3. En effet, comme l'anticorps dirigé contre Akt utilisé dans le cadre de nos études reconnaît aussi Akt2 et Akt3, il serait intéressant d'analyser leur implication dans le contrôle de la restitution épithéliale gastrique. En effet, l'activation précoce d'Akt observée suivant une blessure pourrait être impliquée dans le contrôle d'autres processus cellulaires enclenchés par la réparation de blessures au niveau de la muqueuse gastrique tels que la prolifération et la survie cellulaire (Tsugawa et al., 2003). Ainsi, la contribution de ces différents effecteurs de la PI3K, particulièrement des kinases Akt, au niveau de la restitution épithéliale gastrique sera donc une avenue intéressante à explorer plus en détail dans le futur.

En plus de l'établissement du rôle central de la PI3K dans la modulation de la restitution épithéliale gastrique humaine, les données recueillies dans le cadre de cette étude ont permis de préciser comment les voies de signalisation dépendantes de la PI3K sont activées suivant une blessure en absence des facteurs de croissance exogènes. En effet, l'observation d'un nombre significatif de cellules en migration dans nos essais de restitution en condition basale nous a incités à caractériser les effecteurs en amont responsables d'activer la PI3K. Comme nous avons démontré précédemment que le TGF α et l'EGF sont les plus puissants stimulateurs de la régénération épithéliale gastrique humaine (Tétreault et al., 2005) et que l'implication de l'EGFR dans le contrôle de la migration cellulaire a été rapportée dans plusieurs types de cellules épithéliales (Tarnawski, 2001; Block et al., 2004; Puddicombe et al., 2000; Wells, 1999), nous avons émis l'hypothèse que l'activation de la restitution des cellules HGE-17 en condition basale était possible grâce à un relâchement endogène d'EGF, menant à une activation subséquente de son récepteur EGFR. Afin de vérifier cette hypothèse, les niveaux d'activation du récepteur ont tout d'abord été déterminés à différents intervalles de temps suivant une blessure. L'impact de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR à l'aide de l'inhibiteur pharmacologique PD153035 (Bos et al., 1997) a également été analysé. Puisque l'inhibiteur PD153035 a été rapporté comme pouvant aussi inhiber le PDGFR (Bos et al., 1997), l'expression de l'ARNm du récepteur au PDGF (PDGFR) dans les cellules épithéliales gastriques a également été vérifiée par RT-PCR. Tel qu'attendu, les isoformes α et β du PDGFR ne sont pas exprimés au niveau de l'épithélium gastrique fœtal humain ou des lignées cellulaires gastriques

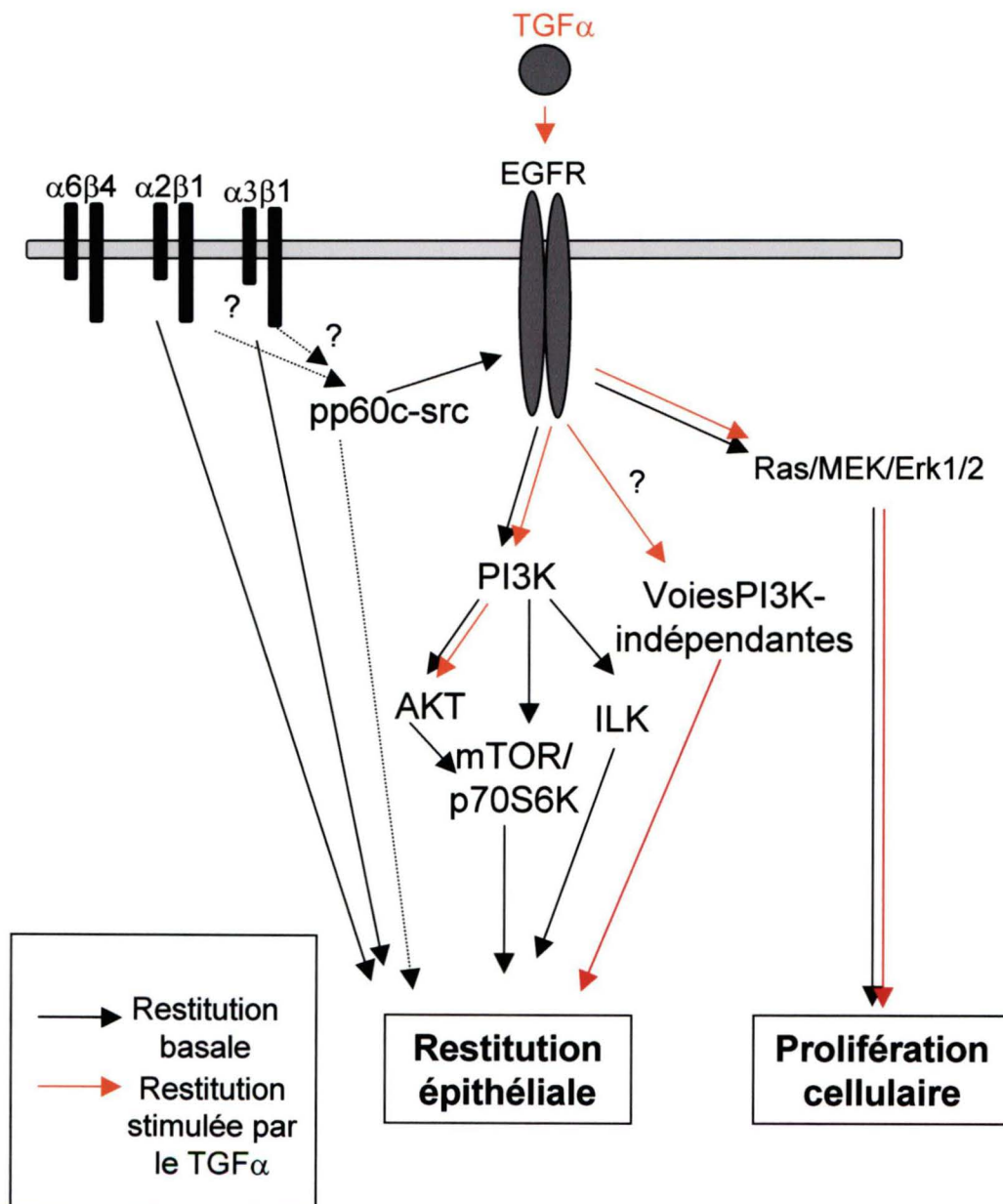
HGE-17 et HGE-20, contrairement aux cellules mésenchymateuses gastriques et intestinales. Ces résultats sont en accord avec des évidences de la littérature ayant rapporté que les cellules cibles classiques du PDGF étaient les fibroblastes et les cellules de muscle lisse (Révisé dans Alvarez et al., 2006). De plus, comme approche additionnelle pour vérifier l'implication de l'EGFR, nous avons traité les monocouches blessées avec l'anticorps neutralisant LA1, un anticorps connu pour se lier avec le domaine extracellulaire du récepteur EGFR (Al-Mustafa et al., 1999). Nos résultats indiquent que l'activation de l'EGFR est nécessaire à l'activation d'Akt et au contrôle de la migration des cellules HGE-17 suivant une blessure en condition basale. Cependant, la démonstration que l'anticorps neutralisant LA1 ne bloque pas l'activation d'Akt et la stimulation de la restitution épithéliale en condition basale suggère que la transactivation de l'EGFR survient par un mécanisme intracellulaire, et non via une stimulation par un ligand extracellulaire. Il est intéressant de constater que dans différentes lignées cancéreuses du côlon, l'activation de l'EGFR survient par un mécanisme intracellulaire médié par la tyrosine kinase Src et qui n'implique pas la liaison de ligands extracellulaires (Pai et al., 2002; Buchanan et al., 2003). En accord avec ces études, nos données démontrent que pp60c-src est activé rapidement suivant l'induction d'une blessure épithéliale, suggérant un rôle pour cette tyrosine kinase dans l'initiation de la restitution épithéliale gastrique. Ces résultats sont également appuyés par des données obtenues avec l'inhibiteur de l'activité kinasique des membres de la famille Src, PP2 (Hanke et al., 1996), qui démontrent qu'un traitement avec cet inhibiteur pharmacologique diminue fortement la capacité de migration des cellules épithéliales gastriques humaines suivant une blessure. De plus, nous avons montré que l'inhibition de l'activité de Src prévient l'activation d'Akt et de l'EGFR normalement obtenue suivant

une blessure dans des conditions basales. La mise en commun de tous ces résultats suggère fortement que suivant une blessure, pp60c-src est rapidement activé, puis phosphorylé et active par la suite l'EGFR. Subséquemment, cette transactivation de l'EGFR résulte en une activation de la voie de signalisation PI3K et de la migration cellulaire. À notre grand étonnement, l'inhibition de l'activité kinasique de Src avec le PP2 a fortement inhibé la capacité de migration des cellules HGE-17 suite à un traitement au TGF α . Il faut se rappeler que nos données ont démontré que l'activation de pp60c-Src survient en amont de la transactivation de l'EGFR (Fig. 32D). D'un autre côté, nous avons aussi établi à l'aide du modèle de micro-blessure que l'activité de pp60c-src était requise pour le contrôle de la phase initiale d'étalement des feuillets épithéliaux suite à l'induction d'une blessure (Fig. 45A). En se basant sur ces évidences, nous proposons que pp60c-Src est essentiel au déclenchement des événements initiateurs survenant suite à une blessure, permettant par la suite l'induction des différents événements cellulaires et moléculaires permettant la progression du processus de restitution épithéliale. Ceci explique probablement pourquoi une stimulation directe de l'EGFR avec le TGF α est incapable d'activer la restitution épithéliale gastrique en présence d'un traitement à l'inhibiteur PP2. Cependant, le signal d'initiation responsable de l'activation de pp60c-src reste encore à être déterminé. Il est fort possible que celui-ci soit relié à une interaction des intégrines avec leurs ligands suivant une blessure. En effet, plusieurs études effectuées dans différentes lignées cellulaires telles que fibroblastes et cellules intestinales ont rapporté que l'activation de pp60c-src joue un rôle dans la transactivation de l'EGFR par les intégrines (Waters et al., 2004; Moro et al., 2002). En accord avec ces données de la

littérature, nous avons récemment obtenu des résultats préliminaires démontrant une implication de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines dans l'activation d'Akt et de la restitution des cellules HGE-17. Il est aussi possible que l'acide lysophosphatidique (LPA), un phospholipide bioactif connu pour agir via les récepteurs couplés aux protéines G (Liliom et al., 1998 ; Contos et al., 2000), soit responsable de l'activation de pp60c-src suite à une blessure. En effet, bien qu'à notre avis ceci soit peu probable, la présence d'une très faible concentration de sérum (0,1%) dans nos essais de restitution ouvre la porte à une implication potentielle des récepteurs au LPA dans le contrôle du processus de restitution épithéliale gastrique. Le rôle du LPA dans la migration cellulaire a été démontré dans plusieurs modèles cellulaires incluant les cellules épithéliales intestinales et les cellules CHO (Sturm et al., 1999; Jiang et al., 2006 ; Sugimoto et al., 2006). Une augmentation de LPA ou de phospholipides apparentés au LPA a d'ailleurs été rapportée dans les cornées de lapin endommagées (Watsky et al., 2000 ; Liliom et al., 2000). De plus, dans les cellules PC12, le LPA a été démontré pour activer Pyk2, qui à son tour se lie et active pp60c-src (Dikic et al., 1996). Dans une étude plus détaillée, le LPA a été rapporté pour augmenter l'activité kinasique de Src dans les cellules de neuroblastomes NIE-115 (Jalink et al., 1993). Une autre possibilité à envisager est que l'initiation de ces voies de signalisation suivant une blessure soit tout simplement la conséquence directe du processus mécanique de la blessure effectuée avec la lame de rasoir.

La Figure 49 illustre notre compréhension actuelle des rôles de l'EGFR et de la PI3K dans la modulation de la régénération épithéliale gastrique humaine. Dans un premier

Figure 49. Schématisation des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la restitution épithéliale gastrique humaine basale et stimulée au $TGF\alpha$.



temps, l'induction du signal d'initiation suivant une blessure active pp60c-Src, ce qui entraîne la phosphorylation et la transactivation de l'EGFR. De façon complémentaire, l'EGFR peut également être activé par ses ligands spécifiques sécrétés dans le milieu de culture suivant une blessure, tels que le TGF α et l'EGF. Finalement, l'activation de l'EGFR mène à l'activation de la cascade de signalisation Ras/MEK/ERK1/2 et à l'activation de la prolifération cellulaire et à l'activation des voies de signalisation dépendantes de la PI3K telles que mTOR/p70S6K et ILK, menant dans ce cas-ci à l'activation de la restitution épithéliale gastrique.

L'utilisation du modèle de blessure avec une lame de rasoir en présence d'hydroxyurée nous a permis de proposer de nouveaux concepts en ce qui a trait à la caractérisation des effecteurs impliqués dans le contrôle de la restitution épithéliale gastrique humaine. Il faut se rappeler que la restitution épithéliale gastrique est un processus qui combine deux événements cellulaires distincts, soit l'étalement et la migration cellulaire. L'analyse des évidences de la littérature nous a permis de constater que les travaux concernant les événements moléculaires contrôlant spécifiquement la phase initiale d'étalement cellulaire durant le processus de restitution épithéliale sont très limités et qu'au niveau de l'estomac, ceux-ci sont même inexistants. Quelques études ont proposé qu'il était possible d'effectuer par aspiration des micro-blessures *in vitro* sur des feuillets épithéliaux de cellules intestinales en culture (Florian et al., 2002; Russo et al., 2005; Lotz et al., 2000), ou encore sur des épidermes embryonnaires (Martin et Lewis, 1992). Ces études ont également suggéré que la réparation de ces micro-blessures s'effectuait par la contraction d'un anneau continu d'actine et, dans certains cas, par la

formation de lamelles au niveau des cellules retrouvées à la marge de la blessure. La mise en commun de toutes ces données de la littérature nous a incités à adapter ce modèle de micro-blessure au niveau des monocouches de cellules gastriques blessées. Ceci a permis de réaliser le dernier objectif de mon projet au doctorat qui consistait à discriminer le rôle des facteurs de croissance et des voies de signalisation qui contrôlent spécifiquement l'étalement versus la migration.

Après avoir initialement établi la surface maximale de la zone dénudée (300 μm) requise pour induire uniquement l'étalement cellulaire suivant une blessure, des micro-blessures de 75 à 100 μm ont été effectuées par aspiration des cellules HGE-17 nouvellement confluentes, à l'aide d'une aiguille préalablement fixée à l'extrémité d'une seringue. Les analyses de microscopie électronique démontrent clairement que les micro-blessures réalisées sur les cellules HGE-17 se referment progressivement et uniquement grâce à l'étalement des cellules du feuillet épithélial suivant une blessure, un processus qui est également caractérisé par la persistance des contacts cellule-cellule et par l'absence de formation de lamellipodes durant tout le processus de réparation. Contrairement à la méthode de blessure avec une lame de rasoir, ce modèle de micro-blessure a ainsi permis d'éliminer le paramètre de migration suivant une blessure et donc de se concentrer uniquement sur la caractérisation des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans l'étalement cellulaire de monocouches gastriques blessées. Il est intéressant de constater que les événements cellulaires impliqués dans la fermeture d'une micro-blessure épithéliale gastrique correspondent exactement à ceux décrits précédemment dans d'autres lignées cellulaires épithéliales intestinales telles que Caco-

2 et T84 (Lotz et al. 2000; Bement et al., 1993). En effet, les analyses morphologiques démontrent clairement que la fermeture de la blessure débute avec la contraction d'un anneau d'actine à la marge de la blessure, générant ensuite une force d'attraction sur la monocouche vers la zone dénudée de la blessure. Cette force d'attraction est subséquentement communiquée aux cellules avoisinantes, les induisant ainsi à s'aplatir et à s'aligner de façon perpendiculaire à la blessure (Lotz et al., 2000). Suivant cette phase intensive d'étalement et d'alignement cellulaire, les cellules localisées à la marge de la blessure développent des lamelles dans le but non seulement de couvrir une surface additionnelle de la blessure, mais également pour générer une force d'attraction supplémentaire sur la monocouche adjacente à la micro-blessure. Pour la première fois, nos analyses de la localisation des composantes du cytosquelette ont permis de mettre en évidence une polymérisation spécifique des microtubules au niveau de lamelles en formation suivant l'induction d'une micro-blessure épithéliale. L'extension des microtubules à l'extrémité de fibroblastes en migration a été rapportée pour permettre le transport de différents organelles et protéines, permettant ainsi de promouvoir les extensions membranaires (Bretscher, 1996). De plus, il a été postulé que les régions riches en microtubules situées dans les astrocytes en migration permettraient de sélectionner, stabiliser et maximiser la formation des adhésions focales (Etienne-Manneville et Hall, 2001). Ainsi, en se basant sur ces évidences, nos résultats suggèrent que la polymérisation des microtubules dans les lamelles en formation suivant une blessure stabilise le cytoplasme des cellules étalées.

Après avoir confirmé la validité de notre modèle de micro-blessure dans des monocouches de cellules HGE-17, l'effet de différents facteurs de croissance exogènes

a été testé sur la capacité d'étalement des cellules épithéliales gastriques humaines. D'abord, il a été intéressant de constater que la fermeture d'une micro-blessure épithéliale gastrique par étalement cellulaire est plus lente dans les conditions basales, mais grandement accélérée en présence de certains facteurs de croissance exogènes. En accord avec les résultats illustrant leur action sur l'étalement cytoplasmique (Figs. 23 et 25), l'EGF et le TGF α accélèrent remarquablement la fermeture des micro-blessures à des concentrations de 5 ng/ml. D'un autre côté, l'étalement des cellules épithéliales gastriques est plus atténué en présence du facteur de croissance HGF et n'est pas induit en présence du facteur de croissance IGF-I. L'ensemble de ces résultats renforce grandement le rôle majeur de l'EGF et du TGF α dans le contrôle de la régénération épithéliale gastrique suivant une blessure et appuie grandement les observations précédentes des ulcérations gastriques ayant révélé l'émergence d'un type cellulaire différencié producteur d'EGF au sein de la muqueuse ulcérée (Wright et al., 1990). Nous proposons ainsi qu'une action de l'EGF et du TGF α au cours de la régénération épithéliale gastrique serait de favoriser l'adaptation phénotypique des cellules différenciées afin qu'elles puissent répondre de façon optimale aux stimuli de la migration et de la prolifération, en plus de contribuer grandement à la reconstruction des glandes gastriques au niveau du tissu de granulation. En effet, suivant une ulcération gastrique, l'EGF et le TGF α pourraient aider à la dilatation des glandes gastriques, permettant de recouvrir rapidement la base de l'ulcère et le tissu de granulation, induisant par la suite la formation de tubes et subséquentement la reconstruction des glandes gastriques à l'intérieur du tissu de granulation.

Afin de mieux comprendre comment les facteurs de croissance et les conditions basales de culture (FBS 0.1%) stimulent l'étalement cellulaire dans les cellules HGE-17 suivant une micro-blessure, nous avons analysé l'effet de l'inhibition de différentes voies de signalisation connues pour contrôler la restitution épithéliale gastrique (Figs. 29-30, 32 et 35). Nos résultats démontrent que les inhibitions des activités de l'EGFR et de la PI3K, à l'aide du PD153035 et du LY294002 respectivement, ralentissent la progression de la fermeture de la blessure dans les conditions basales et suivant une stimulation au $TGF\alpha$. Dans le cas de la condition basale, le contrôle de l'étalement cellulaire suivant l'induction d'une micro-blessure implique également la tyrosine kinase pp60c-Src, puisqu'un traitement avec l'inhibiteur pharmacologique PP2 altère considérablement la fermeture de la blessure. Comme dans la restitution épithéliale, l'étalement cellulaire survient avant l'induction de la migration, ces observations sont en accord avec notre étude précédente ayant démontré le rôle précoce de la voie de signalisation EGFR/PI3K dans le contrôle de ce processus, cette dernière étant activée soit par une stimulation au $TGF\alpha$, soit par une activation par pp60c-src (Tétreault et al., 2007). Il est bien établi qu'à la fois l'introduction d'une forme constitutive active de Src dans les cellules et une stimulation par différents mitogènes mènent à des changements rapides et dramatiques au niveau du cytosquelette (Bromann et al., 2004). En effet, des études menées dans des cellules transformées avec Src ont permis l'identification d'un certain nombre de ses substrats ayant des rôles dans la régulation du cytosquelette d'actine (Parsons et Parsons, 1997; Frame, 2002). Par exemple, p130Cas, identifié comme étant le substrat majeur de v-src, a été démontré pour être localisé dans les ondulations membranaires des cellules épithéliales et neuroectodermes en étalement, plus précisément au

niveau du cytosquelette d'actine (Downey et al., 1992; Chew et al. 2002). Aussi, l'activité kinase de Src et p130Cas ont été rapportés pour être requis dans l'activation intégrine-dépendante de l'EGFR (Moro et al., 2002). D'un autre côté, la PI3K a été démontrée pour induire le dépôt de laminine-5 dans des cultures primaires de kératinocytes, menant subséquemment à un étalement de ces cellules médié par l'intégrine $\alpha3\beta1$ (Nguyen et al. 2000). De plus, la voie PI3K a récemment été rapportée pour stabiliser les microtubules de fibroblastes en migration (Onishi et al., 2007). Comme dans nos études nous avons démontré que la réorganisation du cytosquelette était un événement nécessaire à la fermeture des microblessures, il est possible de spéculer que la voie de signalisation Src/EGFR/PI3K stimule l'étalement cellulaire en agissant au niveau de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette ou encore au niveau de l'interaction de certains composants de la matrice extracellulaire avec les intégrines.

Une autre observation intéressante découlant de cette étude est la démonstration que les activités de p70S6K et d'ILK ne sont pas requises pour la modulation de l'étalement de monocouches épithéliales gastriques suivant l'induction d'une micro-blessure, bien que celles-ci sont nécessaires au contrôle du processus de restitution épithéliale des cellules HGE-17 (Tétreault MP et al., 2007). L'ensemble de ces résultats nous suggère clairement que l'activation des voies de signalisation mTOR/p70S6K et d'ILK sont deux événements requis uniquement pour assurer le contrôle de la migration cellulaire au cours de la restitution épithéliale suivant une blessure. Cette observation est d'ailleurs en accord avec plusieurs évidences de la littérature ayant établi le rôle des voies de

signalisation mTOR/p70S6K (Chandrasekher et al., 2001; Qian et al., 2004) et ILK (Qian et al., 2005) dans le contrôle de la migration cellulaire et les réorganisations cytosquelettiques. Ainsi, l'utilisation à la fois de la méthode de blessure avec une lame de rasoir et de la méthode de micro-blessure par aspiration a permis pour la première fois d'associer des effecteurs de signalisation spécifiques aux différentes phases de la restitution épithéliale.

L'étalement cellulaire est aussi reconnu pour être modulé par les interactions cellule-matrice médiées par les intégrines. Par exemple, les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$ ont été impliquées dans le processus de fermeture des micro-blessures effectuées sur les cellules épithéliales intestinales T84 (Lotz et al., 2000). De plus, notre récente observation que la sous-unité $\beta1$ des intégrines est impliquée dans la modulation de la restitution épithéliale gastrique (résultat préliminaire) nous a incités à vérifier l'implication des sous-unités $\alpha2$, $\alpha3$ et $\alpha6$ dans l'étalement de feuillets épithéliaux suivant l'induction d'une micro-blessure. Nous avons démontré dans des études antérieures que l'expression coordonnée de sous-unités $\alpha2$ et $\alpha3$ des intégrines aussi bien que la redistribution de l'intégrine $\alpha2\beta1$ représente un événement clé pour la différenciation des différents types de cellules sécrétrices de l'épithélium gastrique de surface et glandulaire, nous incitant ainsi à vérifier l'implication de ces sous-unités de ces intégrines dans le processus d'étalement cellulaire (Tremblay et Ménard, 1996; Chénard et al., 2000). De son côté, la sous-unité $\alpha6$ des intégrines est connue pour être présente tout au long de l'axe foveolus-glande de l'estomac (Chénard et al., 2000). Pour ce faire, des essais de neutralisation des sous-unités $\alpha2$, $\alpha3$ et $\alpha6$ des intégrines

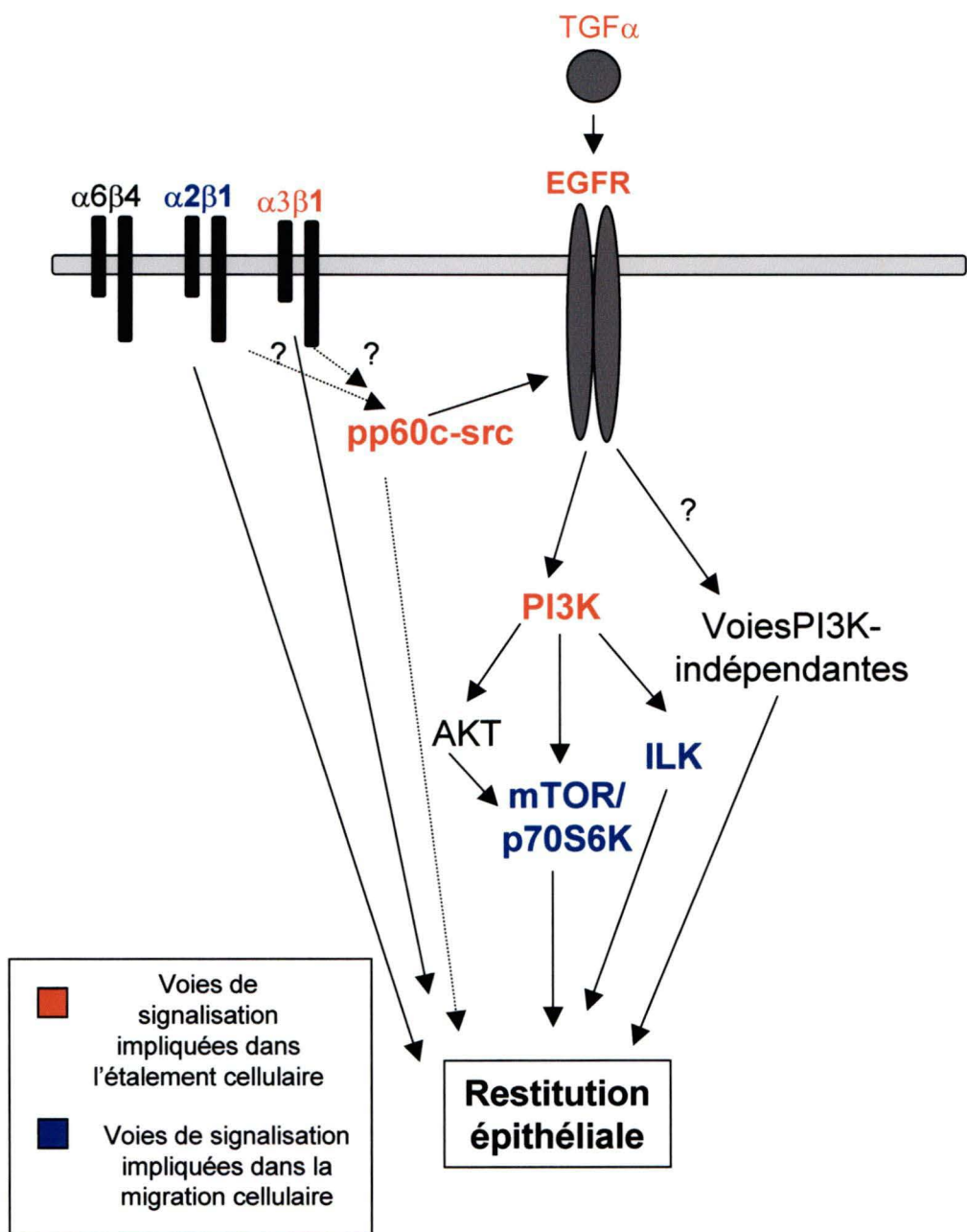
ont été effectués sur des monocouches de cellules HGE-17 blessées. Dans nos essais de micro-blessure, la neutralisation de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines a ralenti fortement la progression de la fermeture des blessures. De plus, l'observation d'une redistribution de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines spécifiquement au niveau des lamelles émergeant des cellules situées à la marge de la blessure suggère que l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ participe directement à la formation des lamelles. Il est également intéressant de constater que des essais de neutralisation à l'aide de l'anticorps bloquant anti- $\alpha 3$ ont fortement réduit la formation des lamelles, suggérant ainsi un rôle spécifique de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ dans la formation de ce type d'extension cytoplasmique. En accord avec ces observations, le rôle de cette intégrine dans le développement de protrusions lamellaires suivant une blessure a été rapporté dans les cellules épithéliales intestinales T84 (Lotz et al., 2000). Nos essais de neutralisation des intégrines ont également démontré que la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines n'était pas impliquée dans la modulation de l'étalement de feuillets épithéliaux gastriques suivant une blessure. Comme nous avons montré précédemment l'implication de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans le contrôle de la restitution épithéliale (Fig. 33), cette observation suggère l'implication spécifique de cette intégrine seulement dans la régulation de la phase migratoire au cours de la restitution épithéliale gastrique. Finalement, l'observation que la neutralisation de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines n'affecte pas la progression de la fermeture des micro-blessures induites dans les cellules HGE-17 écarte une implication de cette sous-unité des intégrines dans la modulation de l'étalement cellulaire suivant l'induction d'une micro-blessure. Ce dernier résultat est en opposition avec une étude effectuée sur les cellules épithéliales intestinales T84 ayant rapporté le rôle de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans la rétraction cellulaire et

la formation des lamelles durant la réparation d'une micro-blessure épithéliale (Lotz et al., 2000), suggérant une fois de plus l'existence de mécanismes de régulation différents au niveau de l'estomac par rapport à l'intestin grêle.

La Figure 50 schématise notre compréhension actuelle des mécanismes responsables de la phase initiale d'étalement cellulaire au cours de la restitution épithéliale gastrique. Nos résultats montrent clairement que les facteurs de croissance exogènes EGF/TGF α sont cruciaux pour intensifier l'étalement cytoplasmique du feuillet épithélial gastrique suivant une micro-blessure. De plus, le signal responsable d'initier cette phase initiale de la restitution épithéliale gastrique n'a pas encore été déterminé mais pourrait être relié à l'intégrine $\alpha3\beta1$. Par la suite, l'induction de la micro-blessure entraîne la phosphorylation et l'activation de pp60c-src, induisant subséquemment la transactivation de l'EGFR et l'activation de la PI3K. À noter que l'EGFR peut également être activé par ses ligands solubles présents dans le milieu de culture suivant une micro-blessure. Finalement, les activations des effecteurs de la PI3K, mTOR/p70S6K et ILK, ne sont pas requises pour la modulation de l'étalement d'une monocouche épithéliale gastrique suivant une blessure.

Les différentes phases de la régénération épithéliale gastrique humaine constituent ainsi des événements cellulaires qui doivent être finement coordonnés afin de maintenir ou de rétablir l'intégrité morphologique et fonctionnelle de la muqueuse. Le travail réalisé dans le cadre de ce projet de thèse, nous permet de proposer le modèle intégrateur suivant (Figure 51). Les différents facteurs de croissance exercent des actions

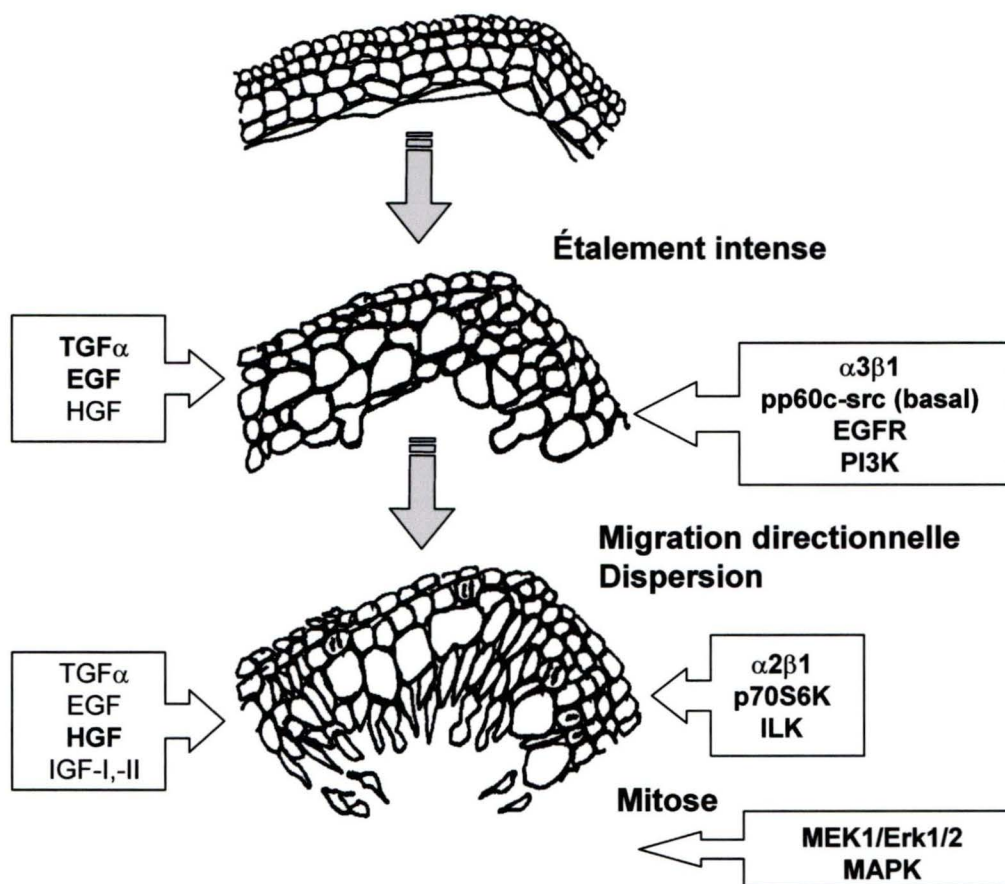
Figure 50. Résumé des facteurs de croissance, des voies de signalisation et des intégrines impliqués dans la régulation de l'étalement cellulaire au cours de la restitution épithéliale gastrique humaine basale et stimulée au TGF α .



différentielles et non redondantes dans la modulation des différentes phases de la régénération épithéliale gastrique. Suivant des dommages au niveau de l'épithélium gastrique, les facteurs de croissance relâchés par le tissu IGF-I et IGF-II vont rapidement stimuler l'alignement des cellules épithéliales bordant la blessure. Parallèlement, la production des facteurs de croissance EGF et TGF α et l'activation subséquente de leur récepteur EGFR vont initier et intensifier l'étalement cellulaire peu de temps suivant l'induction de la blessure de la monocouche épithéliale. Par la suite, la production du facteur de croissance HGF et l'activation de son récepteur c-met vont permettre l'allongement des cellules situées à la marge de la blessure et l'initiation d'un processus de migration directionnelle. Une fois la phase intensive de migration terminée et si cette dernière n'est pas suffisante pour sceller la blessure épithéliale, l'ensemble des facteurs de croissance vont induire les processus de prolifération cellulaire, permettant ainsi le remplacement des cellules perdues et la production de nouvelles cellules afin de sceller définitivement la blessure épithéliale.

D'autre part, les mécanismes de signalisation intracellulaire identifiés dans le cadre de cette étude peuvent aussi être intégrés dans notre modèle de la façon suivante. Dans un premier temps, très peu de temps suivant la production d'une blessure au niveau de l'épithélium gastrique, l'induction d'un signal d'initiation possiblement relié à l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ enclenche l'activation de la tyrosine kinase pp60c-src, ce qui entraîne la transactivation du récepteur de l'EGF. De façon supplémentaire, l'activation de l'EGFR peut être stimulée grâce à la sécrétion de ses ligands spécifiques (EGF, TGF α) dans le milieu environnant la blessure. Par la suite, l'activation du récepteur de l'EGF entraîne

Figure 51. Modèle de régénération épithéliale gastrique. La progression de la régénération épithéliale gastrique repose sur une activation coordonnée de différents événements cellulaires et moléculaires permettant de maintenir ou de rétablir l'intégrité morphologique et fonctionnelle de la muqueuse.



l'activation précoce de la voie de signalisation de la PI3K entraînant l'étalement cellulaire. Dans un deuxième temps, l'intégrine $\alpha2\beta1$ et l'activation des voies de signalisation dépendantes de la PI3K (p70S6K, ILK) vont mener à la régulation de la phase intensive de migration cellulaire suivant l'étalement cellulaire. Il est important de souligner que l'activation de l'EGFR sera également responsable de l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK MAPK, si besoin afin d'enclencher la phase proliférative de la régénération épithéliale gastrique.

V- PERSPECTIVES

Nos études nous ont permis de générer de nouveaux concepts concernant les mécanismes régulateurs spécifiquement impliqués dans la modulation des différentes phases du processus de régénération épithéliale gastrique humaine. Cependant, ces études ont également soulevé un bon nombre de questions qui restent encore à être élucidées.

Par exemple, tel qu'il a été discuté précédemment, il sera important d'identifier le signal d'initiation responsable de l'activation de la tyrosine kinase pp60c-Src suivant une blessure en absence de facteurs de croissance exogènes, et aussi subséquemment de l'initiation des cascades d'événements responsables de la progression des différentes étapes de la régénération épithéliale gastrique humaine. D'ailleurs, il serait tentant de spéculer sur une implication potentielle des intégrines dans l'initiation de ces multiples cascades de signalisation. En effet, l'activation de l'EGFR a été rapportée comme pouvant être médiée par les intégrines de façon indépendante de la liaison au ligand (Moro et al., 2002). De plus, nos essais de neutralisation de différentes sous-unités des intégrines nous ont permis de générer de nouvelles données et de nombreuses hypothèses de travail, plus précisément en ce qui a trait aux intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$. Il serait donc fort souhaitable d'approfondir les rôles de ces intégrines dans le contrôle de la restitution épithéliale gastrique, en plus d'établir s'il existe une coopération entre les récepteurs des facteurs de croissance et les intégrines dans notre modèle.

Il sera également intéressant d'analyser la contribution de la voie de signalisation Wnt- β -caténine dans la modulation de la régénération épithéliale gastrique humaine. En effet, nous possédons des résultats préliminaires démontrant une relocalisation de la β -caténine dans le noyau des cellules HGE-17 situées au front de migration suivant une blessure. Comme la présence de signaux extracellulaires Wnts a été associée avec une accumulation de la β -caténine dans la cellule (Widelitz, 2005; Papkoff, 1997), ces résultats laissent présager une activation de la voie de signalisation Wnt suivant une blessure épithéliale. Autre fait intéressant, les protéines APC et GSK3 β font partie d'un multi-complexe protéique qui est régulé par la signalisation des Wnts (Bienz, 2000; Polakis, 2000) et qui est responsable de la phosphorylation de la β -caténine. De plus en plus d'évidences tendent à démontrer le rôle de GSK3 β et d'APC dans le contrôle de la polarité cellulaire durant la migration cellulaire, plus précisément au niveau de la réorientation du Golgi et du centre organisateur des microtubules (Etienne Manneville et Hall, 2003; Nathke, 2004; Etienne Manneville et al., 2005). Finalement, il sera intéressant d'analyser le rôle des cibles importantes de la voie de signalisation Wnt- β -caténine, telles que les ephrines et leurs récepteurs (Batlle et al., 2002). En effet, une implication des récepteurs des ephrines de classe B a été démontrée récemment dans le contrôle de la prolifération des cellules souches épithéliales et de la migration (positionnement) des cellules progénitrices épithéliales intestinales (Batlle et al., 2002; Holmberg et al., 2006). À la lumière de toutes ces évidences, on ne peut que constater

qu'il y a beaucoup de travail à faire concernant l'analyse de l'implication de la voie de signalisation Wnt dans le processus de régénération épithéliale gastrique.

Les efforts devront également se poursuivre afin de trouver les effecteurs de signalisation responsables d'expliquer les actions différentielles, particulièrement morphologiques des facteurs de croissance EGF, TGF α , HGF et IGFs sur la restitution épithéliale gastrique humaine. En effet, jusqu'à maintenant, les voies de signalisation identifiées dans le cadre de nos travaux de recherche sont communes à la restitution basale et stimulée aux facteurs de croissance TGF α et HGF. Il est donc possible de penser que les effecteurs de signalisation responsables de l'action différentielle des facteurs de croissance se situent plus en aval de la PI3K, probablement au niveau des RhoGTPases. En effet, il a été démontré qu'une compartimentalisation à l'intérieur de la cellule et une coordination temporelle de l'activité des différents membres de la famille des RhoGTPases sont nécessaires à la régulation de la migration cellulaire neuronales et de fibroblastes (Raftopoulou et Hall, 2004; Nakamura et al., 2006). Par exemple, l'activation localisée de Cdc-42 à l'extrémité des cellules en migration, en association avec le complexe PAR6-PKC ζ , a été rapportée pour jouer un rôle dans la régulation de la migration directionnelle (Etienne-Manneville et al., 2003). D'autre part, une diminution de l'activité de la protéine RhoA, ou encore de son effecteur ROCK a été associée avec la formation de cellules de type <<leader>> suivant l'induction d'une blessure (Omelchenko et al., 2003). La

contribution spécifique des différents membres de la famille des RhoGTPases et de leurs effecteurs constituera ainsi une avenue fort intéressante à explorer dans le futur.

L'ensemble de notre travail nous a donc permis d'énoncer de nouvelles idées et jeter les bases pour continuer à progresser vers l'établissement de nouveaux concepts sur les mécanismes régulateurs des fonctions épithéliales gastriques humaines dans des situations physiologiques et pathologiques. Par exemple, de façon plus générale, les notions générés dans cette étude pourraient s'avérer utiles pour améliorer la compréhension des mécanismes régissant la migration cellulaire et l'invasion tumorale dans les cas de cancer gastrique.

D'un point de vue beaucoup plus philosophique, certains s'interrogeront peut-être sur la pertinence de s'attarder à la compréhension détaillée des événements cellulaires et moléculaires responsables de moduler la restitution épithéliale, argumentant qu'il est plutôt vital de focaliser sur la caractérisation des processus d'angiogénèse et de reconstruction des glandes gastriques. Toutefois, il est important de se rappeler que le processus de restitution est essentiel à la cicatrisation d'un ulcère puisqu'il favorise le rétablissement d'une barrière physique continue, permettant ainsi de séparer le tissu de granulation de la lumière de l'estomac. Donc, en protégeant le tissu de granulation des blessures mécanique et chimique ou encore des infections, le processus de restitution

prend tout son sens puisque cela lui permet de procurer l'environnement local critique requis pour la guérison des ulcères gastriques.

Il est bien connu que le résultat final du processus de cicatrisation d'un ulcère est le reflet d'une interaction dynamique entre la composante épithéliale de la zone de réparation retrouvée à la marge de l'ulcère et la composante du tissu conjonctif provenant du tissu de granulation (Tarnawski, 1995). De plus, tout dépendamment de ces interactions, la muqueuse cicatrisée peut conséquemment être de bonne ou de mauvaise qualité. En effet, des analyses *in vivo* effectuées sur différentes muqueuses provenant d'ulcères gastriques expérimentaux macroscopiquement réparés ont révélé plusieurs anomalies histologiques et ultra-structurales au niveau de ces tissus telles qu'une diminution de l'épaisseur des muqueuses, une dilatation marquée des glandes gastriques, une augmentation du tissu conjonctif, une désorganisation du réseau micro-vasculaire et une augmentation de la perméabilité capillaire (Tarnawski, 1995 ; Tarnawski, 2005). Il a alors été proposé que ces anomalies pourraient interférer avec les mécanismes de défense de la muqueuse et causer la récurrence des ulcères lors de la présence des facteurs ulcérogéniques. Ces observations indiquent donc que contrairement à ce qu'on aurait pu présager, ce n'est pas la vitesse de réparation d'un ulcère qui constitue le facteur le plus important dans la détermination de la récurrence d'un ulcère, mais bien la qualité de la restauration de la structure de la muqueuse. Ainsi, la connaissance des modulateurs impliqués dans le processus de régénération épithéliale gastrique et

surtout, de leurs mécanismes d'action, devraient contribuer au développement d'approches thérapeutiques ciblées afin d'améliorer le processus de guérison des blessures de la muqueuse gastrique humaine. Il va sans dire qu'il faudra bien évidemment s'attarder également dans le futur à la compréhension détaillée des autres aspects fondamentaux de la réparation d'un ulcère, tels que la reconstruction des glandes gastriques et l'angiogénèse.

VI- CONCLUSIONS

L'ensemble de ce travail nous a permis de réaliser des progrès significatifs et d'établir de nouveaux concepts concernant la régulation de la régénération épithéliale gastrique humaine. D'abord, nos résultats démontrent clairement l'implication des facteurs de croissance exogènes dans le contrôle de la régénération épithéliale gastrique humaine via un mécanisme indépendant de la signalisation du TGF β (spécifique à l'estomac). Les actions différentielles observées sur l'adaptation, la migration et la prolifération cellulaire infirment donc le concept d'une action redondante des facteurs de croissance et suggèrent plutôt une action coordonnée de ceux-ci, assurant ainsi la progression de la régénération de l'épithélium suivant une blessure. La mise au point de deux différents modèles *in vitro* de blessure (lame de rasoir, micro-blessure) a permis la dissection des mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant spécifiquement les différentes phases (étalement, migration, prolifération) de la régénération épithéliale gastrique humaine. De toute évidence, il apparaît que la voie de signalisation EGFR/PI3K est un médiateur central de la restitution épithéliale, cette dernière étant activée soit par une stimulation au facteur de croissance TGF α , soit suite à une activation intracellulaire par la protéine kinase pp60c-src. De plus, la caractérisation des voies de signalisation a également permis de mettre en évidence l'implication différentielle des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ dans la modulation de ce processus. Finalement, l'ensemble de nos résultats suggère très fortement que les mécanismes régulant la régénération épithéliale gastrique divergent significativement de ceux retrouvés au niveau de l'épithélium intestinal. Cette observation renforce donc la pertinence et l'urgence d'approfondir

l'étude de tous ces mécanismes au niveau de l'estomac. Il va sans dire que l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'homéostasie des différents compartiments de l'unité fonctionnelle de la muqueuse gastrique humaine est d'une importance capitale. En effet, plus nous connaissons de façon détaillée les modulateurs spécifiques impliqués et leurs mécanismes d'action dans la régulation du processus de régénération des cellules épithéliales gastriques, plus nous aurons de cibles potentielles pour la mise au point d'approches thérapeutiques ciblées dans le traitement des différentes pathologies nécessitant un maintien de l'intégrité de la muqueuse ou une régénération épithéliale.

VII- REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier sincèrement mes directeurs de thèse. Daniel et Nathalie, j'aimerais vous remercier pour la confiance que vous m'avez témoignée tout au long de mes études graduées. Merci également d'avoir été aussi attentionnés à mon égard et aussi compréhensifs lors de la préparation de chacune de mes présentations et aussi lors de mes moments de stress intenses. J'ai retiré beaucoup des nombreuses discussions que nous avons eues dans chacun de vos bureaux respectifs. Nathalie, j'ai beaucoup apprécié que tu m'intègres dans tes réunions de laboratoire, cela m'a permis d'améliorer grandement mes qualités scientifiques, mais surtout, d'acquérir beaucoup de confiance en moi. Ta passion pour la science est extrêmement contagieuse! Daniel, je te suis très reconnaissante de m'avoir offert un projet de recherche aussi passionnant et de m'avoir souvent laissé la liberté de le faire progresser à ma guise. Sans aucune réserve, je vous admire énormément en tant que chercheurs, mais aussi en tant que personnes. Un gros merci pour tout!

Je tiens également à remercier tout spécialement le Dr Pierre Chailler. Mon cher chouchou, merci pour tout le temps que tu m'as consacré au cours de mes études graduées, pour ta patience légendaire, ton incroyable bonté, pour les nombreuses discussions que nous avons eues et les précieux conseils que tu m'as prodigués. Tu es une vraie perle rare.

Un gros merci à Lina Corriveau et Anne Vézina pour les nombreuses discussions que nous avons entretenues, qu'elles aient été de nature scientifique ou technique. Vous avez beaucoup facilité mon partage entre les laboratoires des Drs Ménard et Rivard. Je remercie également Aline Simoneau. Dommage que notre collaboration ait débuté aussi tardivement. Je tiens également à te dire un gros merci pour tous les services que tu m'as rendus depuis mon départ à Philadelphie, tu m'as été d'une aide précieuse. Je salue aussi tous les membres des laboratoires des Drs Ménard et Rivard que j'ai cotoyés au cours de ces cinq dernières années. Dû à votre très grand nombre, je ne vous nommerai pas, de peur d'en oublier. J'ai beaucoup apprécié nos nombreuses discussions colorées et les multiples sorties que nous avons effectuées tous ensemble. Merci également à Dominique Jean, Pierre Pothier, Pierre Magny et Rémi Gauthier pour leur aide technique.

Je tiens à remercier de tout mon cœur mes amis et ma famille. Merci beaucoup de votre disponibilité, votre appui et vos encouragements continuels. Vous comptez beaucoup pour moi. Je tiens absolument à exprimer toute ma gratitude et mon amour à mes parents adorés. Papa, maman, je vous suis extrêmement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis toutes ces années. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours encouragé à faire ce qui me passionne. Il est clair que sans vous, je ne me serais jamais rendue là. Je vous adore!

Finalement, je tiens à remercier tout le corps professoral, les techniciens, les étudiants et les secrétaires du département d'Anatomie et de Biologie cellulaire pour leur aide et leur appui tout au long de mes études graduées. Un merci tout spécial à la Dre Nathalie Perreault pour m'avoir grandement aidé dans mes démarches pour mon post-doctorat à Philadelphie.

VIII-RÉFÉRENCES

Abu-Ghazaleh R, Kabir J, Jia H, Lobo M, Zachary I. 2001. Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochem J* 360:255-264.

Acconcia F, Manavathi B, Mascarenhas J, Talukder AH, Mills G, Kumar R. 2006. An inherent role of integrin-linked kinase-estrogen receptor alpha interaction in cell migration. *Cancer Res* 66:11030-11038.

Ahn NG, Weiel JE, Chan CP, Krebs EG. 1990. Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 265:11487-11494.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1992. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York. Garland Science.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. 1995. PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.

Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. 1999. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 277:G631-641.

Al Moustafa AE, Yansouni C, Alaoui-Jamali MA, O'Connor-McCourt M. 1999. Up-regulation of E-cadherin by an anti-epidermal growth factor monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* 5:681-686.

Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. 2006. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc* 81 : 1241-1257.

Arnold R, Frank M, Simon B, Eissele R, Koop H. 1992. Adaptation and renewal of the endocrine stomach. *Scand J Gastroenterol* 193:20-27.

Bailly M, Condeelis J. 2002. Cell motility: insights from the backstage. *Nat Cell Biol* 4:E292-294.

Bartman AE, Buisine MP, Aubert JP, Niehans GA, Toribara NW, Kim YS, Kelly EJ, Crabtree JE, Ho SB. The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J Pathol* 186:398-405.

Basque JR, Chailier P, Menard D. 2002. Laminins and TGF-beta maintain cell polarity and functionality of human gastric glandular epithelium. *Am J Physiol* 282:C873-C884.

Basque JR, Chailier P, Perreault N, Beaulieu JF, Menard D. 1999. A new primary culture system representative of the human gastric epithelium. *Exp Cell Res* 253:493-502.

Basque JR, Chenard M, Chailier P, Menard D. 2001. Gastric cancer cell lines as models to study human digestive functions. *J Cell Biochem* 81:241-251.

Basson MD, Modlin IM, Madri JA. 1992. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* 90:15-23.

Basson MD, Rashid Z, Turowski GA, West AB, Emenaker NJ, Sqambati SA, Hong F, Perdakis DM, Datta S, Madri JA. 1996. Restitution at the cellular level: regulation of the migrating phenotype. *Yale J Biol Med* 69:199-129.

Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van der Wetering M, Pawson T, Clevers H. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251-263.

Bement WM, Forscher P, Mooseker MS. 1993. A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. 121:565-578.

Berven LA, Crouch MF. 2000. Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. Immunol Cell Biol 78:447-451.

Bienz M, Clevers H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. Cell 103:311-320.

Bindschadler M, McGrath JL. 2007. Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics. J Cell Sci 120:876-884.

Birchmeier C, Gherardi E. 1998. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. Trends Cell Biol 8:404-410.

Block ER, Matela AR, SundarRaj N, Iszkula ER, Klarlund JK. 2004. Wounding Induces Motility in Sheets of Corneal Epithelial Cells through Loss of Spatial Constraints: Role of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor Signaling. J Biol Chem 279:24307-24312.

Bos M, Mendelsohn J, Kim YM, Albanell J, Fry DW, Baselga J. 1997. PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clinical Cancer Research* 3:2099-2106.

Boucher MJ, Morisset J, Vachon PH, Reed JC, Laine J, Rivard N. 2000. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 79:355-369.

Bretscher MS. 1996. Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell* 87:601-606.

Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. 2004. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23:7967-7968.

Brown MT, Cooper JA. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287:121-149.

Bruggeman JL, Wood JG, Davenport HW. 1979. Local control of blood flow in the dog's stomach: vasodilatation caused by acid back-diffusion following topical application of salicylic acid. *Gastroenterology* 77:736-744.

Brunet A, Pouyssegur J. 1997. Mammalian MAP kinase modules: how to transduce specific signals. *Essays Biochem* 32:1-16.

Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence JC Jr, Abraham RT. 1996. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* 15:5256-5267.

Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN. 2003. Prostaglandin E2 Regulates Cell Migration Via the Intracellular Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem* 278:35451-35457.

Byrd JC, Yan P, Sternberg L, Yunker CK, Scheiman JM, Bresalier RS. 1997. *Gastroenterology* 113:455-464.

Cantrell DA. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114:1439-1445.

Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC. 1993. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem* 268:9478-9483.

Carpenter CL, Tolias KF, Van Vugt A, Hartwig J. 1999. Lipid kinases are novel effectors of the GTPase Rac1. *Adv Enzyme Regul* 39:299-312.

Cartlidge SA, Elder JB. 1989. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor levels in normal human gastrointestinal mucosa. *Br J Cancer* 60:657-660.

Chailier P, Basque JR, Corriveau L, Ménard D. 2000. Functional characterization of the keratinocyte growth factor system in human fetal gastrointestinal tract. *Pediatr Res* 48:504-510.

Chailier P, Ménard D. 2005. Establishment of human gastric epithelial (HGE) cell lines exhibiting barrier function, progenitor, and prezymogenic characteristics. *J Cell Physiol* 202:263-274.

Chailier P, Ménard D. 1999. Ontogeny of EGF receptors in the human gut. *Front Biosci* 15:D87-101.

Chandrasekher G, Kakazu AH, Bazan HE. 2001. HGF- and KGF-induced activation of PI-3K/p70 s6 kinase pathway in corneal epithelial cells: its relevance in wound healing. *Exp Eye Res* 73:191-202.

Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ. 1995. c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* 130:355-368.

Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.

Cheatham L, Monfar M, Chou MM, Blenis J. 1995. Structural and functional analysis of pp70S6k. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11696-11700.

Chénard M, Basque JR, Chailier P, Tremblay E, Beaulieu JF, Ménard D. 2000. Expression of integrin subunits correlates with differentiation of epithelial cell lineages in developing human gastric mucosa. *Anat Embryo (Berl)* 202:223-233.

Chew CS, Chen X, Parente JA Jr, Tarrer S, Okamoto C, Qin HY. 2002. Lasp-1 binds to non-muscle F-actin in vitro and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly in vivo. *J Cell Sci* 115:4787-4799.

Choma DP, Pumiglia K, DiPersio CM. 2004. Integrin alpha3beta1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J Cell Sci* 117:3947-3959.

Chou MM, Blenis J. 1996. The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell* 85:573-583.

Chung CY, Funamoto S, Firtel RA. 2001. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* 26:557-566.

Ciacchi C, Lind SE, Podolsky DK. 1993. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 105:93-101.

Clemmons DR. 1998. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 140:19-24.

Contos JJ, Ishii I, Chun J. 2000. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 58 : 1188-1196.

Crouch MF. 1997. Regulation of thrombin-induced stress fibre formation in Swiss 3T3 cells by the 70-kDa S6 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 233:193-199.

De Bolos C, Garrido M, Real FX. 1995. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* 109:723-734.

Dennis PB, Pullen N, Kozma SC, Thomas G. 1996. The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases. *Mol Cell Biol* 16:6242-6251.

Dieckgraefe BK, Weems DM, Santoro SA, Alpers DH. 1997. ERK and p38 MAP kinase pathways are mediators of intestinal epithelial wound-induced signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 233:389-394.

Dignass AU, Podolsky DK. 1993. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 105:1323-1332.

Dikic I, Tokiwa G, Courtneidge SA, Schlessinger J. 1996. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383 : 547-550.

Di Paolo G, De Camilli P. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651-657.

Downes CP, Gray A, Fairservice A, Safrany ST, Batty IH, Fleming I. 2005. The Regulation of Membrane to Cytosol Partitioning of Signalling Proteins by

Phosphoinositides and their Soluble Headgroups. *Biochem Soc Trans* 33:1303-1307.

Downey GP, Chan CK, Lea P, Takai A, Grinstein S. 1992. Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. *J Cell Biol* 116:695-706.

Doza YN, Cuenda A, Thomas GM, Cohen P, Nebreda AR. 1995. Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. *FEBS Lett* 364:223-228.

Dumont FJ, Su Q. 1996. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci* 58:373-395.

English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH. 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253:255-270.

Etienne-Manneville S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic* 5:470-477.

Etienne-Manneville S, Manneville JB, Nicholls S, Ferenczi MA, Hall A. 2005. Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol* 170:895-901.

Etienne-Manneville S, Hall A. 2003. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421:753-756.

Etienne-Manneville S, Hall H. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106:489-498.

Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.

Ferrari S, Thomas G. 1994. S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29:385-413.

Filipenko NR, Attwell S, Roskelley C, Dedhar S. 2005. Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene* 24:5837-5839.

Flores-Benitez D, Ruiz-Cabrera A, Flores-Maldonado C, Shoshani L, Cereijido M, Contreras RG. 2007. Control of tight junctional sealing: role of Epidermal Growth Factor. *Am J Physiol* 292:F828-F836.

Florian P, Schoneberg T, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH. 2002. Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *J Physiol* 545:485-499.

Frame MC. 2002. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602:114-130.

Frank DE, Carter WG. 2004. Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. *J Cell Sci* 117:1351-1361.

Garner A, Flemstrom G, Allen A. 1984. Current concepts of gastroduodenal mucosal protection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 92-78-80.

Gray JD, Shiner M. 1967. Influence of gastric pH on gastric and jejunal flora. *Gut* 8:74-81.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschilis PN, Larue L. 2003. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 63:2172-2178.

Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehenbre F. 2006. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J* 25:3534-3545.

Hall A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33:891-895.

Hannigan GE, Leung-Hagestijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379:91-96.

Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. 1996. Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. Study of Lck- and FynT-Dependent T Cell Activation. *J Biol Chem* 271:695-701.

Hanks SK, Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576-596.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-52.

Hansen MD, Nelson WJ. 2001. Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1:effector complex. *Curr Biol* 11:356-360.

Helander HF. 1981. The cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol* 70:217-289.

Heylings JR, Hurst BC, Garner A. 1984. Effect of luminal acid on gastric and duodenal bicarbonate transport. *Scand J Gastroenterol Suppl* 92:59-62.

Hills BA, Butler BD, Lichtenberger LM. 1983. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am J Physiol* 244:G561-568.

Ho SB, Robertson AM, Shekels LL, Lyftogt CT, Niehans GA, Toribara NW. 1995. Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology* 109:999-1001.

Hollande F, Blanc EM, Bali JP, Whitehead RH, Pelegri A, Baldwin GS, Choquet A. 2001. HGF Regulates Tight Junctions in New Nontumorigenic Gastric Epithelial Cell Line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G910-21.

Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ, Silvany RE, Henkemeyer M, Frisen J. 2006. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 125:1151-1163.

Hopkins AM, Bruewer M, Brown GT, Pineda AA, Ha JJ, Winfree LM, Walsh SV, Babbitt BA, Nusrat A. 2004. Epithelial cell spreading induced by hepatocyte growth factor influences paxillin protein synthesis and posttranslational modification. *Am J Physiol* 287:G886-898.

Hormi K, Lehy T. 1994. Developmental expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor proteins in the human pancreas and digestive tract. *Cell Tissue Res* 278:439-450.

Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N. 2001. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* 276:21885-21894.

Hunter T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-36.

Isenberg JI, McQuaid K, Laine L and Walsh JH. 1995. Acid peptic disorders. In : *Textbook of gastroenterology*. 2nd ed. T. Yamada (Ed), J.B. Lippincott, Philadelphia, 1374-1430.

Isotani S, Hara K, Tokunaga C, Inoue H, Avruch J, Yonezawa K. 1999. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. *J Biol Chem* 274:34493-34498.

Jalink K, Eichholtz T, Postma FR, van Corven EJ, Moolenaar WH. 1993. Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ* 4 : 247-255.

Jiang X, Jacamo R, Zhukova E, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. 2006. RNA interference reveals a differential role of FAK and Pyk2 in cell migration, leading edge formation and increase in focal adhesions induced by LPA in intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 207 : 816-828.

Just I, Fritz G, Aktories K, Giry M, Popoff MR, Boquet P, Hegenbarth S, von Eichel-Streiber C. 1994. Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 269:10706-10712.

Karam SM, Leblond CP. 1993. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. *Anat Rec* 236:259-279.

Karam S. 1995. New insights into the stem cells and the precursors of the gastric epithelium. *Nutrition* 11:607-613.

Karam S, Leblond CP. 1995. Origin and migratory pathways of the eleven epithelial cell types present in the body of the mouse stomach. *Microsc Res Tech* 31:193-214.

Karni R, Jove R, Levitzki A. 1999. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 18:4654-4662.

Kato K, Chen MC, Nguyen M, Lehmann FS, Podolsky DK, Soll AH. 1999. Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures. *Am J Physiol* 276:G1105-1116.

Keely PJ, Parise LV. 1996. The alpha2beta1 Integrin is a Necessary Co-Receptor for Collagen-Induced Activation of Syk and the Subsequent Phosphorylation of Phospholipase Cgamma2 in Platelets. *J Biol Chem* 271: 26668-26676.

Kermorgant S, Walker F, Hormi K, Dessirier F, Lewin MJ, Lehy T. 1997. Developmental expression and functionality of hepatocyte growth factor and c-Met in human fetal digestive tissues. *Gastroenterology* 112:1635-1647.

Kheradmand F, Folkesson HG, Shum L, Derynk R, Pytela R, Matthay MA. 1994. Transforming growth factor-alpha enhances alveolar epithelial cell repair in a new in vitro model. *Am J Physiol* 267:L728-738.

Khokhlatchev A, Xu S, English J, Wu P, Schaefer E, Cobb MH. 1997. Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases. *J Biol Chem* 272:11057-11062.

Kobayashi O, Watanabe S, Hirose M, Sato N. 1996. Effects of transforming growth factors on the wound repair of cultured rabbit gastric mucosal cells. *J Gastroenterol Hepatol* 11:129-136.

Koegl M, Zlatkine P, Ley SC, Courtneidge SA, Magee AI. 1994. Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* 303:749-753.

Komada M, Kitamura N. 1993. The cell dissociation and motility triggered by scatter factor/hepatocyte growth factor are mediated through the cytoplasmic domain of the c-Met receptor. *Oncogene* 8:2381-2390.

Kozma SC, Thomas G. 2002. Regulation of Cell Size in Growth, Development and Human Disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays* 24:65-71.

Kretzschmar M. 2000. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Transforming growth factor-beta/SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Res* 2:107-115.

Kwaja A, Lehmann K, Marte BM, Downward J. 1998. Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. *J Biol Chem* 273:18793-18801.

Lacy ER. 1995. Rapid epithelial restitution in the stomach: an updated perspective. *Scand J Gastroenterol Suppl* 210:6-8.

Lambert S, Vind-Kezunovic D, Karvinen S, Gniadecki R. 2006. Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol* 126:954-962.

Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R. 2006. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:20-31.

Li Y, Jiang B, Ensign WY, Vogt PK, Han J. 2000. Myogenic Differentiation Requires Signalling through both Phosphatidylinositol 3-Kinase and p38 MAP Kinase. *Cell Signal* 12:751-757.

Liliom K, Guan Z, Tseng JL, Desiderio DM, Tigyi G, Warsky MA. 1998. Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury. *Am J Physiol* 274 : C1065-1074.

Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Cell locomotion. In : *Molecular Cell Biology*. 4th ed. WH. Freeman (Ed). W.H. Freeman and Company. New York, 1374.

Lorenz RG, Gordon JL. 1993. Use of transgenic mice to study regulation of gene expression in the parietal cell lineage of gastric units. *J Biol Chem* 268:26559-26570.

Lotz MM, Rabinovitz I, Mercurio AM. 2000. Intestinal restitution: progression of actin cytoskeleton rearrangements and integrin function in a model of epithelial wound healing. *Am J Physiol* 156:985-996.

Maehiro K, Watanabe S, Hirose M, Iwazaki R, Miwa H, Sato N. 1997. Effects of epidermal growth factor and insulin on migration and proliferation of primary cultured rabbit gastric epithelial cells. *J Gastroenterol* 32:573-578.

Marais R, Wynne J, Treisman R. 1993. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73:381-393.

Martin P, Lewis J. 1992. Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing. *Nature* 360:179-183.

Ménard D. 1994. Development of human intestinal and gastric enzymes. *Acta Paediatr Suppl* 405:1-6.

Ménard D. 2004. Functional development of the human gastrointestinal tract: hormone- and growth factor-mediated regulatory mechanisms. *Can J Gastroenterol* 18:39-44.

Ménard D, Arsenault P. 1990. Cell proliferation in developing human stomach. *Anat Embryol (Berl)* 182:509-16.

Ménard D, Monfils S, Tremblay E. 1995. Ontogeny of human gastric lipase and pepsin activities. *Gastroenterology* 108:1650-1656.

Moiseeva EP, Heukers R, Manson MM. 2007. EGFR and Src are involved in indole-3-carbinol-induced death and cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 28:435-445.

Moon SY, Zheng Y. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13:13-22.

Moro L, Dolce L, Cabodi S, Bergatto E, Erba EB, Smeriglio M, Turco E, Retta SF, Giuffrida MG, Venturino M, et al. 2002. Integrin-Induced Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Activation Requires c-Src and p130Cas and Leads to Phosphorylation of Specific EGF Receptor Tyrosines. *J Biol Chem* 277:9405-9414.

Nakamura T, Kurokawa K, Kiyokawa E, Matsuda M. 2006. Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes. *Methods Enzymol* 406:315-332.

Nathke IS. 2004. The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *20*:337-366.

Nguyen BP, Gil SG, Carter WG. 2000. Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem* 275:31896-31907.

Nielsen UB, Cardone MH, Sinskey AJ, MacBeath G, Sorger PK. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16):9330-5.

Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.

Nusrat A, Delp C, Madara JL. 1992. Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells. *J Clin Invest* 89:1501-1511.

O'Connor KL, Mercurio AM. 2001. Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J Biol Chem* 276:47895-47900.

Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM. 2003. Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10788-10793.

Onishi K, Higuchi M, Asakura T, Masuyama N, Gotoh Y. 2007. The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. *Genes Cells* 12:535-546.

Pai R, Jones MK, Tomikawa M, Tarnawski AS. 1999. Activation of Raf-1 during experimental gastric ulcer healing is Ras-mediated and protein kinase C-independent. *Am J Pathol* 155:1759-1766.

Pai R, Ohta M, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. 1998. Induction of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 114:706-713.

Pai R, Tarnawski A. 1998. Signal transduction cascades triggered by EGF receptor activation: relevance to gastric injury repair and ulcer healing. *Dig Dis Sci* 43:14S-22S.

Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. 2002. Prostaglandin E2 Transactivates EGF Receptor: A Novel Mechanism for Promoting Colon Cancer Growth and Gastrointestinal Hypertrophy. *Nat Med* 8:289-293.

Papkoff J. 1997. Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. *J Biol Chem* 272:4536-4543.

Parsons JT, Parsons SJ. 1997. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:187-192.

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10:885-892.

Pearson RB, Dennis PB, Han JW, Williamson NA, Kozma SC, Wettenhall RE, Thomas G. 1995. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J* 14:5279-5287.

Pichard V, Honore S, Kovacic H, Li C, Prevot C, Briand C, Rognoni JB. 2001. Adhesion, actin cytoskeleton organisation and the spreading of colon adenocarcinoma cells induced by EGF are mediated by alpha2beta1 integrin low clustering through focal adhesion kinase. *Histochem Cell Biol* 116:337-348.

Playford MP, Schaller MD. 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23:7928-7946.

Podolsky DK. 1994. Peptide growth factors in the gastrointestinal tract. In : Physiology of the Gastrointestinal Tract. L Johnson (Ed.), Raven Press, New York, 159-174.

Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. Genes Dev 14:1837-1851.

Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell 112:453-465.

Pring M, Prime S, Parkinson E, Paterson I. 2006. Dysregulated TGF-beta1-induced Smad signalling occurs as a result of defects in multiple components of the TGF-beta signalling pathway in human head and neck carcinoma cell lines. Int J Oncol 28:1279-1285.

Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. 2000. Involvement of the Epidermal Growth Factor Receptor in Epithelial Repair in Asthma. FASEB J 14:1362-1374.

Pullen N, Thomas G. 1997. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. FEBS Lett 410:78-82.

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353:670-674.

Qian Y, Corum L, Meng Q, Blenis J, Zheng JZ, Shi X, Flynn DC, Jiang BH. 2004. PI3K Induced Actin Filament Remodeling through Akt and p70S6K1: Implication of Essential Role in Cell Migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C153-63.

Qian Y, Zhong X, Flynn DC, Zheng JZ, Qiao M, Wu C, Dedhar S, Shi X, Jiang BH. 2005. ILK Mediates Actin Filament Rearrangements and Cell Migration and Invasion through PI3K/Akt/Rac1 Signaling. *Oncogene* 24:3154-3165.

Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. 2004. Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. *Mol Hum Reprod* 10:677-684.

Qiu W, Schonleben F, Li X, Su GH. 2007. Disruption of transforming growth factor beta-Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of SMAD2 and SMAD4. *Cancer Lett* 245:163-170.

Raftopoulou M, Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265:23-32.

Resh MD. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451:1-16.

Ridley AJ. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114:2713-2722.

Ridley AJ et Hall A. 1992a. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. 1992b. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410.

Rojas M, Yao S, Lin YZ. 1996. Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. *J Biol Chem* 271:27456-27461.

Rubin W, Ross LL, Sleisenger MH, Jefries GH. 1968. The normal human gastric epithelia. A fine structural study. *Lab Invest* 19:598-626.

Russo JM, Florian P, Shen L, Graham VW, Tretiakova MS, Gitter AH, Mrsny RJ, Turner JR. 2005. Distinct temporal-spatial roles for rho kinase and myosin light

chain kinase in epithelial purse-string wound closure. *Gastroenterology* 128:987-1001.

Sanders MJ, Ayalon A, Roll M, Soll AH. 1985. The apical surface of canine chief cell monolayers resists H⁺ back-diffusion. *Nature* 313:52-54.

Santos MF, McCormack SA, Guo Z, Okolicany J, Zheng Y, Johnson LR, Tiqyi G. 1997. Rho proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution. *J Clin Invest* 100:216-225.

Scheid MP, Woodgett JR. 2001. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:760-768.

Schmidt A, Hall A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-1609.

Sharma GD, Ottino P, Bazan NG, Bazan HE. 2005. Epidermal and hepatocyte growth factors, but not keratinocyte growth factor, modulate protein kinase C α translocation to the plasma membrane through 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis. *J Biol Chem* 280(9):7917-24.

Silen W, Ito S. 1985. Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface. *Annu Rev Physiol* 47:217-229.

Smart JE, Oppermann H, Czernilofsky AP, Purchio AF, Erikson RL, Bishop JM. 1981. Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6013-6017.

Stromblad S, Andersson G. 1993. The coupling between transforming growth factor- α and the epidermal growth factor receptor during rat liver regeneration. *Exp Cell Res* 204:321-328.

Sturm A, Sudermann T, Schulte KM, Goebell H, Dignass AU. 1999. Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro by lysophosphatidic acid. *Gastroenterology* 117 : 368-377.

Sugimoto N, Takuwa N, Yoshioka K, Takuwa Y. 2006. Rho-dependent, Rho kinase-independent inhibitory regulation of Rac and cell migration by LPA-1 receptor in Gi-inactivated CHO cells. *Exp Cell Res* 312 : 1899-1908.

Takahashi M, Ota S, Shimada T, Hamada E, Kawabe T, Okudaira T, Matsumura M, Kaneko N, Terano A, Nakamura T et al. 1995. Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture. *J Clin Invest* 95:1994-2003.

Tarnawski A. 1995. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment. Scand J Gastroenterol Suppl 219:9-14.

Tarnawski AS. 2001. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. Dig Dis Sci 50:S24-33.

Tarnawski AS. 2005. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. Dig Dis Sci 50 Suppl 1:S24-33.

Tarnawski A. 2000. Molecular mechanisms of ulcer healing. Drug News Perspect 13:158-168.

Tarnawski A, Hollander D, Stachura J, Krause WJ, Eltorai M, Dabros W, Gergely H. 1990. Vascular and microvascular changes--key factors in the development of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. J Clin Gastroenterol 12:S148-157.

Tarnawski AS, Jones MK. 1998. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. J Clin Gastroenterol 27:S12-20.

Tarnawski AS, Pai R, Wang H, Tomikawa M. 1998. Translocation of MAP (Erk-1 and -2) kinases to cell nuclei and activation of c-fos gene during healing of experimental gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 49:479-488.

Tarnawski A, Stakura J, Durbin T, Sarfeh IJ, Gergely H. 1992. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 102:695-698.

Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B. 2001. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris* 95:337-344.

Teller IC, Beaulieu JF. 2001. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 2001:1-18.

Tetreault MP, Chailier P, Beaulieu JF, Rivard N, Menard D. 2007. Epidermal growth factor receptor-dependent PI3K activation promotes restitution of wounded human gastric epithelial monolayers. *J Cell Physiol* (soumis).

Tetreault MP, Chailier P, Rivard N, Menard D. 2005. Differential growth factor induction and modulation of human gastric epithelial regeneration. *Exp Cell Res* 306:285-297.

Thomas SM, Brugge JS. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cel Dev Biol* 13:513-609.

Thoresen GH, Guren TK, Sandnes D, Peak M, Aqius L, Christoffersen T. 1998. Response to transforming growth factor alpha (TGFalpha) and epidermal growth factor (EGF) in hepatocytes: lower EGF receptor affinity of TGFalpha is associated with more sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase and greater efficacy in stimulation of DNA synthesis. *J Cell Physiol* 175:10-18.

Tremblay E, Basque JR, Rivard N, Ménard D. 1999. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha down-regulate human gastric lipase gene expression. *Gastroenterology* 116:831-841.

Tremblay E, Chailier P, Ménard D. 2001. Coordinated control of fetal gastric epithelial functions by insulin-like growth factors and their binding proteins. *Endocrinology* 142:1795-1803.

Tremblay E, Ménard D. 1996. Differential expression of extracellular matrix components during the morphogenesis of human gastric mucosa. *Anat Rec* 245:668-676.

Tremblay E, Monfils S, Ménard D. 1997. Epidermal growth factor influences cell proliferation, glycoproteins, and lipase activity in human fetal stomach. *Gastroenterology* 112:1188-1196.

Tsugawa K, Jones MK, Akahoshi T, Moon WS, Maehara Y, Hashizume M, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. 2003. Abnormal PTEN Expression in Portal Hypertensive Gastric Mucosa: A Key to Impaired PI 3-kinase/Akt Activation and Delayed Injury Healing? *FASEB J* 17:2316-2318.

Vachon PH, Loechel F, Xu H, Wever UM, Engvall W. 1996. Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol* 134:1483-1497.

Vanhasebroeck B, Alessi DR. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346:561-576.

Vanhasebroeck B, Waterfield MD. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253:239-254.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248.

Wallace JL, Granger DN. 1996. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J* 10:731-740.

Wallace JL. 1989. Gastric resistance to acid: is the "mucus-bicarbonate barrier" functionally redundant? *Am J Physiol* 256:G31-38.

Watsky MA, Griffith M, Wang DA, Tigyi GJ. Phospholipid growth factors and corneal wound healing. *Ann NY Acad Sci* 905 : 142-158.

Watanabe S, Hirose M, Wang XE, Kobayashi O, Nagahara A, Murai T, Iwazaki R, Miwa H, Miyazaki A, Sato N. 2000. Epithelial-mesenchymal interaction in gastric mucosal restoration. *J Gastroenterol* 35:65-68.

Watanabe S, Hirose M, Wang XE, Maehiro K, Murai T, Kobayashi O, Mikami H, Otaka K, Miyazaki A, Sato N. 1995. A new model to study repair of gastric mucosa using primary cultured rabbit gastric epithelial cells. *J Clin Gastroenterol* 21:S40-44.

Watanabe S, Hirose M, Wang XE, Maehiro K, Murai T, Kobayashi O, Nagahara A, Sato N. 1994. Hepatocyte growth factor accelerates the wound repair of cultured gastric mucosal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1453-1460.

Watanabe S, Wang XE, Hirose M, Oide H, Kitamura T, Miyazaki A, Sato N. 1995. Basic fibroblast growth factor accelerates gastric mucosal restoration in vitro by promoting mesenchymal cell migration and proliferation. *J Gastroenterol Hepatol* 10:627-632.

Waters C, Pyne S, Pyne NJ. 2004. The Role of G-Protein Coupled Receptors and Associated Proteins in Receptor Tyrosine Kinase Signal Transduction. *Semin Cell Dev Biol* 15:309-323.

Weernink PA, Rijksen G. 1995. Activation and translocation of c-Src to the cytoskeleton by both platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 270:2264-2267.

Wells A. 1999. EGF Receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31:637-643.

Weng QP, Andrabi K, Klippel A, Kozlowski MT, Williams LT, Avruch J. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activation of p70 S6 kinase in situ through site-specific p70 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5744-5748.

Weng QP, Andrabi K, Kozlowski MT, Grove JR, Avruch J. 1995. Multiple independent inputs are required for activation of the p70 S6 kinase. *Mol Cell Biol* 15:2333-2340.

Widelitz R. 2005. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors* 23:111-116.

Wong WM, Playford RJ, Wright NA. 2000. Peptide gene expression in gastrointestinal mucosal ulceration: ordered sequence or redundancy? *Gut* 46:286-292.

Wright NA, Pike C, Elia G. 1990. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature* 343:82-85.

Wu C. 1999. Integrin-linked kinase and PINCH : partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J Cell Sci* 112:4485-4489.

Wu C, Dedhar S. 2001. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol* 155:505-510.

Wymann MP, Marone R. 2005. Phosphoinositide 3-Kinase in Disease: Timing, Location, and Scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* 17:141-149.

Wymann MP, Pirola L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436:127-150.

Yamanaka I, Koizumi M, Baba T, Yamashita S, Suzuki T, Kudo R. 2003. Epidermal growth factor increased the expression of alpha2beta1-integrin and modulated integrin-mediated signaling in human cervical adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 286:165-174.

Zhang J, Zhang F, Ebert D, Cobb MH, Goldsmith EJ. 1995. Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* 3:299-307.

Zhang Y, Guo L, Chen K, Wu C. 2002. A critical role of the PINCH-integrin-linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration. *J Biol Chem* 277:318-326.